

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



TESIS

**INESTABILIDAD CROMOSÓMICA ESPECÍFICA EN NEOPLASIA
CERVICAL EVALUADA MEDIANTE TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA
MOLECULAR**

POR

CATALINA GARCÍA VIELMA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA**

MARZO, 2017

**INESTABILIDAD CROMOSÓMICA ESPECÍFICA EN NEOPLASIA
CERVICAL EVALUADA MEDIANTE TÉCNICAS DE
CITOGENÉTICA MOLECULAR**

DIRECCIÓN DE TESIS

DIRECTOR INTERNO: DR. PABLO ZAPATA BENAVIDES

DIRECTOR EXTERNO: DRA. ELVA I. CORTÉS GUTIÉRREZ

ÍNDICE

<u>SECCIÓN</u>	<u>PÁGINA</u>
AGRADECIMIENTOS	viii
DEDICATORIAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	xv
RESUMEN	xvii
SUMMARY	xviii
1. INTRODUCCION	1
2. JUSTIFICACIÓN	3
3. HIPÓTESIS	3
4. OBJETIVOS	4
4.1 Objetivo General	4
4.2 Objetivos Particulares	4
5. ANTECEDENTES	5
5.1 Epidemiología	5
5.2 Historia	6
5.3 Factores de riesgo para la infección	7
5.4 Patología	
5.4.1 Clasificación de las lesiones	8
5.5 Diagnóstico	
5.5.1 Citología	9
5.5.2 Citología en base líquida	10
5.5.3 Colposcopia	11
5.5.4 Inspección visual con ácido acético y lugol	11
5.5.5 Biopsia	12
5.6 Otras metodologías diagnósticas para VPH	
5.6.1 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente	13

5.6.2	Captura de híbridos	13
5.6.3	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	14
5.6.4	PCR en tiempo real (Q-PCR)	14
5.6.5	Secuenciación	15
5.6.6	Genotipificación del VPH	15
5.7	Tratamiento	
5.7.1	Cirugía	16
5.7.2	Conización	16
5.7.3	Radioterapia	16
5.7.4	Quimioterapia	16
5.8	Prevalencia, Regresión y Persistencia	17
5.9	Virus del Papiloma Humano	
5.9.1	Clasificación de los virus	18
5.9.2	Biología Molecular del VPH	18
5.9.3	Región Larga de control (LCR)	19
5.9.4	Proteína E6	20
5.9.5	Proteína E7	21
5.9.6	Proteínas L1 y L2	22
5.10	Ciclo Viral	
5.10.1	Ingreso a la célula	22
5.10.2	Mantenimiento del genoma	24
5.10.3	Fase Proliferativa	24
5.10.4	Amplificación del genoma y síntesis de viriones	25
5.11	Inmunología	25
5.12	Prevención	26
5.13	Inestabilidad Cromosómica	27
5.14	Cromotripsis	31
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	
6.1	Criterios de inclusión	34
6.2	Criterios de exclusión	34
6.3	Cuantificación y viabilidad celular	34
6.4	Inclusión de células en laminillas de agarosa	35
6.5	DBD-FISH	35
6.5.1	Cometa	35

6.5.2	Cometa alcalino	36
6.5.3	Cometa neutro	36
6.6	Controles positivos y negativos	36
6.7	Cometa-FISH	37
6.8	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente	37
6.9	Análisis al microscopio de fluorescencia	
6.9.1	DBD-FISH	38
6.9.2	Cometa	38
6.10	Análisis de imagen	38
6.11	Genotipificación de VPH por INNO-LiPA	39
6.12	Análisis estadístico	40
7.	RESULTADOS	
7.1	Cuantificación y viabilidad celular	41
7.2	Controles positivos y negativos	41
7.2.1	Sonda CEP 8	42
7.3	Pacientes	42
7.4	Sonda de genoma completo	42
7.4.1	Análisis de imagen sonda de genoma completo	43
7.5	Validación de resultados por técnica de Cometa	44
7.5.1	Cometa alcalino	44
7.5.2	Cometa neutro	44
7.6	Sonda CEP 1	46
7.6.1	Análisis de imagen sonda CEP 1	46
7.7	Validación de resultados por técnica de Cometa-FISH	47
7.8	Sonda CEP 3	48
7.8.1	Análisis de imagen sonda CEP 3	48
7.9	Sonda de secuencia única 1p36 / 1ptel	49
7.9.1	Análisis de imagen sonda 1p36	49
7.9.2	Análisis de imagen sonda 1ptel	50
7.10	Sonda de secuencia única 3q26 PIK3CA	51
7.10.1	Análisis de imagen sonda 3q26 PIK3CA	51
7.11	Genotipificación de VPH por INNO-LiPA	52
8.	DISCUSIONES	53
9.	CONCLUSIONES	59

10. PERSPECTIVAS	60
11. BIBLIOGRAFÍA	61
RESUMEN BIOGRÁFICO	72
LOGROS ALCANZADOS	74

AGRADECIMIENTOS

A todas las instituciones que hicieron posible la realización de este trabajo: Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN) del IMSS, al Hospital Regional de Especialidades No. 23 Ignacio Morones Prieto, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L.

A la Dra. Elva Irene Cortés Gutiérrez por haberme permitido realizar este trabajo en su laboratorio y bajo su asesoría. Gracias por confiar en mí, por permitirme ser parte de tu equipo de trabajo, gracias por todas tus enseñanzas y por tu amistad.

Al Dr. Pablo Zapata Benavides, Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales, Dr. Edgar Mendoza Gamboa y Dr. Juan Manuel Alcocer González por su valiosa dirección y asesoría.

Al Dr. Ricardo M. Cerda Flores por el apoyo estadístico para la realización de este trabajo y por su amistad.

A todo el personal de enfermería de la consulta de Ginecología-Oncológica del Departamento de Oncología, Clínica #23, IMSS, especialmente al Dr. Fernando Hernández Garza y Dr. Homero Sánchez Dávila por el apoyo clínico brindado. A los pasantes de servicio social de la UDEM: Clyo Alejandra Espinosa Pereyra y Luis Miguel Mireles, por su apoyo con las encuestas de los pacientes y la toma de muestras.

A la Q.C.B. Sanjuana Leticia Guardado Limón, gracias por ser mi amiga, por tus enseñanzas en muchos aspectos de la vida y por motivarme siempre a alcanzar mis metas. A la Dra. Martha I. Dávila Rodríguez por todo tu apoyo incondicional, tu compañerismo y amistad.

A todos mis compañeros del CIBIN, personal de base y estudiantes con los que compartí historias y experimentos: Silvia, Barbie, Carolina, Clyo, Miguel, Gloria, Aracely, Bernardo y Karla, porque todos ustedes son parte importante de este proyecto.

A mis compañeros de posgrado: Willi, Miriam y Mayela porque la vida nos puso a recorrer este camino juntos, gracias por todo.

A mis amigas: Betty, Susana, Rossy, Caro, Lupita y Nadia, por escucharme y siempre motivarme a conseguir mis sueños.

DEDICATORIAS

A mi esposo Amaury Lara por su apoyo incondicional, por ayudarme siempre y soñar mis sueños, por caminar a mi lado en todos mis proyectos y motivarme siempre a alcanzarlos. Gracias infinitas!

A mi hija Kathia Daniela Lara García, por todo su apoyo y amor, que aunque a su corta edad no sabe que es una tesis de doctorado, espero enseñarle que todo se logra en esta vida con dedicación, organización y esfuerzo. A mi bebecito, que es un regalo de Dios y de la vida y que aún lo llevo en mi vientre te esperamos con mucho amor.

A la memoria de mis padres Mónica Vielma Rodríguez y Raúl García Álvarez quienes me enseñaron a salir adelante y fueron mi ejemplo de vida.

A mis hermanas Mónica y Gardenia y a mis cuñados Luis y Edgar, gracias por ser mi familia, por todo su apoyo, sus porras y su amistad.

A mis sobrinos Mafer y Alexis, por ser como hermanos para mi hija y quererla y acompañarla siempre.

A la memoria de mis perritas Puffy y Smucker que son parte importante de mi familia, porque cuando estuvieron junto conmigo me acompañaban y se desvelaban conmigo a escribir la tesis y hacer mis presentaciones.

Y sobre todo a Dios.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	PÁGINA
1. Factores de riesgo en el paciente para la infección de VPH.	7
2. Valores de DI obtenida por el Image J en las hibridaciones con sonda de genoma completo en las muestras de mujeres controles y pacientes con LIE-BG y LIE-AG.	43
3. Porcentaje de cometas alcalinos en las células cervicales de pacientes con CaCU y mujeres controles.	44
4. Porcentaje de cometas neutros en las células cervicales de pacientes con CaCU y mujeres controles.	45
5. Valores de DI obtenida por el Image J en las hibridaciones con sonda CEP 1 en las muestras de mujeres controles y pacientes con LIE-BG y LIE-AG	47
6. Valores de DI obtenida por el Image J en las hibridaciones con sonda CEP 3 en las muestras de mujeres controles y pacientes con LIE-BG y LIE-AG.	49
7. Valores de DI obtenida por el Image J en las hibridaciones con sonda de secuencia única 1p36 (roja) en las muestras de mujeres controles y pacientes con LIE-BG y LIE-AG.	50
8. Valores de DI obtenida por el Image J en las hibridaciones con sonda de secuencia única 1ptel (verde) utilizada como control en las muestras de mujeres controles y pacientes con LIE-BG y LIE-AG.	50
9. Valores de DI obtenida por el Image J en las hibridaciones con sonda de secuencia única 3q26 PIK3CA (verde) en las muestras de mujeres controles y pacientes con LIE-BG y LIE-AG.	51
10. Genotipos de VPH encontrados en los grupos de pacientes estudiadas	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	PÁGINA
1. Incidencia de cáncer cérvico uterino a nivel mundial en el 2012. WHO Organización Mundial de la Salud 2015, Globocan 2012. Cifras por 100,000 habitantes. Tomada de http://globocan.iarc.fr/ disponible en web.	5
2. Clasificación de las lesiones de CaCU en el epitelio cervical. Biopsia de epitelio cervical con tinción de hematoxilina y eosina. a) Epitelio normal, b) NIC 1, c) NIC 2 y d) NIC 3 (Tomado de Richart 1990, disponible en web).	9
3. Genoma del VPH. Es una molécula de DNA circular de doble cadena dividida en 3 regiones: LCR, Región temprana que contiene los genes E1 a E6 y Región tardía que contiene los genes L1 y L2. Modificado de López-Saavedra y Lizcano-Soberón 2006	19
4. Interacción de E6 y E7 en el ciclo celular. (Tomada de López-Saavedra y Lizcano-Soberón 2006).	22
5. Etapas de infección por el VPH. El virus infecta a las células de la membrana basal del epitelio escamoso, para permanecer en estado episomal para posteriormente migrar a las células más superficiales donde puede o no integrarse al DNA celular. (Modificado de Woodman et al 2007).	24
6. Mecanismo del fenómeno de cromotripsis. Un estímulo o estrés impacta a un cromosoma normal, esto hace que haya rupturas de doble cadena en la molécula de DNA con el posterior pegado de los fragmentos en zonas de micro-homología en diferente orden con o sin pérdida de regiones, lo que da lugar a la formación de cromosomas derivados, diferentes al cromosoma original. (Modificado de Stephens et al. 2012)	32
7. Controles positivo y negativo de la técnica de DBD-FISH. a) Control positivo: Células de raspado cervical de mujeres sin ningún tipo de lesión cervical con pretratamiento con H ₂ O ₂ , sometidas a la técnica de DBD-FISH e hibridadas con sonda de genoma completo marcado en verde y contrastado con yoduro de propidio, se puede observar el daño severo causado por el H ₂ O ₂ . b) Control negativo: Células de raspado cervical de mujeres sin ningún tipo de lesión cervical sometidas a la técnica de DBD-FISH e hibridadas con sonda de genoma completo marcado en verde y contrastado con yoduro de propidio, se puede observar el daño basal	41
8. Células de raspado cervical después de tratamiento de DBD-FISH hibridadas con sonda centromérica del cromosoma 8 marcada en rojo y contrastado con DAPI-Antifade (azul). a) Control, b) Paciente con	42

- LIE-BG y c) Paciente con LIE-AG.
9. Células de raspado cervical después de tratamiento de DBD –FISH con sonda de genoma completo marcado en rojo y contrastado con DAPI-Antifade (azul). a) Control, b) Paciente con LIE-BG y c) Paciente con LIE-AG. 43
 10. **Validación de la técnica de DBD-FISH con cometa alcalino y cometa neutro. (a-d) DBD-FISH:** Células de epitelio cervical sometidas a la técnica de DBD-FISH e hibridadas con sonda de genoma completo marcado en verde y contrastado con DAPI-antifade (azul). Se observa daño: a) Basal en mujer control, b) Leve en paciente con LIE-BG, c) Moderado en paciente con LIE-BG y d) Severo en paciente con LIE-AG. **(a'-d') Cometa alcalino.** El tipo de daño observado en el DBD-FISH corresponde al tipo de cometa: a') Basal, en mujer control, b') Leve en paciente con LIE-BG, c') Moderado en paciente con LIE-BG y d') Severo en paciente con LIE-AG. **(a''-d'') Cometa neutro.** a'') Basal, en mujer control, b'') Leve en paciente con LIE-BG, c'') Moderado en paciente con LIE-BG y d'') Severo en paciente con LIE-AG. 45
 11. Células de raspado cervical después de tratamiento de DBD–FISH hibridadas con sonda centromérica del cromosoma 1 (CEP 1) marcada en rojo y contrastado con DAPI-Antifade: mujeres controles (a), Pacientes con LIE-BG (b) y LIE-AG (c). 46
 12. **DBD-FISH y COMETA-FISH** en células de raspado cervical. En la parte superior se muestran células de raspado cervical sometidas a la técnica de DBD-FISH e hibridadas con sonda centromérica del cromosoma 1 (CEP 1) marcada en rojo y contrastado con DAPI-antifade, donde se observa el daño: a) Basal en mujeres controles, b) Leve en pacientes con LIE-BG, c) Moderado en pacientes con LIE-BG y d) Severo en pacientes con LIE-AG. En la imagen inferior se muestran células de raspado cervical sometidas a la técnica de cometa-FISH e hibridadas con sonda específica centromérica del cromosoma 1 (CEP 1) marcado en rojo y contrastado con DAPI-antifade, se pueden observar los diferentes tipos de cometas y la hibridación encontrada en cada uno de ellos: a') Basal, b') Leve, c') Moderado y d') Severo. Se considera como daño solamente las señales que se encuentran dentro del cometa. 47
 13. Células de raspado cervical después de tratamiento de DBD–FISH hibridadas con sonda centromérica del cromosoma 3 (CEP 3) marcada en rojo y contrastado con DAPI-Antifade: a) mujeres controles, b) Pacientes con LIE-BG y c) Pacientes con LIE-AG. 48
 14. Células de raspado cervical después de tratamiento de DBD–FISH hibridadas con sonda de secuencia única 1p36 (roja)/1ptel (verde), contrastado con DAPI-Antifade. a) mujeres controles, b) Pacientes con LIE-BG y c) LIE-AG 49

- 15.** Células de raspado cervical después de tratamiento de DBD–FISH 51
hibridadas con sonda de secuencia única 3q26 PIK3CA marcada en
verde y contrastada con DAPI-Antifade. a) Mujeres controles, b)
Pacientes con LIE-BG y c) LIE-AG.

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AIS	Adenocarcinoma <i>in situ</i>
CaCU	Cáncer Cérvico Uterino
CEP	Centromeric probe, Sonda centrómerica
CIS	Cáncer <i>in situ</i>
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DBD	DNA breakage detection
DBD-FISH	DNA breakage detection- fluorescence <i>in situ</i> hybridization
DI	Densidad integrada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsb	daño doble al DNA
dUTP	2'-Deoxyuridine, 5'-Triphosphate
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization
FITC	Fluoresceína-5-isotiocianato
ICH	Intercambio de cromátides hermanas
kDa	Kilodalton
LCR	Long Control Region, Región Larga de Control
LFS	Li-Fraumeni syndrome. Síndrome de Li-Fraumeni
LIE-BG	Lesión intraepitelial de bajo grado
LIE-AG	Lesión intraepitelial de alto grado
LMA	Leucemia mielocítica aguda
µg	Microgramo
MN	Micronúcleo
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i> . Reparación por recombinación no homóloga
NIC ó CIN	Neoplasia intraepitelial cervical, <i>Cervical intraepithelial neoplasia</i>
nm	Nanómetro
n	tamaño de muestra
nM	nanomolar
P	brazo corto del cromosoma
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	potencial de hidrógeno
PIK3CA	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase

q	brazo largo del cromosoma
SHH-MB	Sonic-hedgehog-driven medulloblastoma
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
ssb	daño simple al DNA
SSC	Saline Buffer
ssDNA	DNA de cadena sencilla
TBE	Buffer Tris/Borate/EDTA
TIFF	Tagged Image File Format
VLP	Virus-like particle, Partículas tipo virus
VPH	Virus del Papiloma Humano

RESUMEN

El cáncer cérvico uterino (CaCU) ocupa el cuarto lugar como causa de muerte a nivel mundial y el segundo en nuestro país por neoplasias malignas en la mujer. El 99.8% de los casos el CaCU está relacionado con la infección por el virus del papiloma humano (VPH) del cual existen virus de alto riesgo asociados con la progresión de la enfermedad. Otro factor importante en el desarrollo de la lesión es la inestabilidad cromosómica en la célula y que conduce al desarrollo de aneuploidías, rearrreglos cromosómicos, etc., que producen a su vez cambios a nivel génico como apagado de genes supresores de tumor, encendido de oncogenes, que individualmente o en conjunto promueven al desarrollo del tumor.

En el año 2011, se describió un proceso llamado cromotripsis que postula que todos los rearrreglos son generados a partir de un solo evento catastrófico en la célula con el posterior pegado de los fragmentos en zonas de micro-homología, lo que da lugar a la formación de cromosomas derivativos. Se han realizado pocos estudios al respecto pero se ha encontrado asociación entre cromotripsis y mal pronóstico de algunas enfermedades, como neuroblastoma y mieloma múltiple. En CaCU, se ha encontrado asociación entre los estadios de cáncer cervical y aneusomía del cromosoma 1, así como inestabilidad en secuencias de 5 pb de DNA satélite del cromosoma 1, lo que se pretende asociar con el fenómeno de cromotripsis.

En el presente trabajo, se estudiaron muestras de epitelio cervical de pacientes con lesión intraepitelial de bajo grado (LIE-BG), lesión intraepitelial de alto grado (LIE-AG) y muestras de mujeres sin ningún tipo de lesión cervical a las que se les realizaron pruebas de citogenética molecular para evaluar inestabilidad de regiones específicas de los cromosomas 1 y 3 (CEP 1, CEP 3, 1q36 y 3q26), tomando como base la literatura revisada. Encontramos, que el daño en esas secuencias específicas del DNA de las pacientes con neoplasia cervical fue mayor que en el grupo de mujeres controles, evidenciamos signos de cromotripsis y se encontró que todas las pacientes con LIE-AG, presentaron VPH de alto riesgo.

SUMMARY

Cervical cancer (CC) is the fourth largest cause of death worldwide and the second in our country for malignancies in women. 99.8% of cases the CC are related to virus infection (HPV) human papillomavirus which high-risk virus associated with disease progression exist. Another important factor lesion development is chromosomal instability in the cell and leading to the development of aneuploidy, chromosomal rearrangements, etc., which produce changes at the gene level like, turn off tumor suppressor genes, oncogenes ignition which individually or jointly promote the development of the tumor.

In 2011 was described a process called chromothripsis, which postulates that all rearrangements are generated from a single catastrophic event in the cell with the bonding of the fragments in areas of micro-homology, resulting in the formation of derivative chromosomes. There have been few studies on the subject but found association between chromothripsis and poor prognosis of some diseases, such as multiple myeloma and neuroblastoma.

In CC, was found association between stages of cervical cancer and aneusomy of chromosome 1 and instability sequences 5 bp satellite DNA of chromosome 1, which is associated with the phenomenon of chromothripsis.

In the present work, samples of cervical epithelium of patients with intraepithelial lesion low grade (L-SIL), intraepithelial lesion high grade (H-SIL) and samples of women were studied without any cervical lesion, which are conducted molecular cytogenetic tests to evaluate instability of specific regions of chromosomes 1 and 3 (CEP 1, CEP 3 1q36 and 3q26), based on the literature reviewed.

We found that the damage to these specific sequences in the DNA of patients with cervical neoplasia was higher than in the control group women, we show signs of chromothripsis and found that all patients with H-SIL, presented high-risk HP.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer cérvico uterino (CaCU) es la cuarta causa de muerte a nivel mundial por neoplasias malignas en la mujer, con una incidencia de 526,000 y causando 266,000 defunciones reportadas en el año 2012. En nuestro país es la segunda causa de muerte (Ferlay et al. 2012). Se sabe que en el 99.8% de los casos el CaCU está relacionado con la infección por el virus del papiloma humano (VPH) (López-Saavedra y Lizano-Soberón 2006, Snijders et al. 2006).

Se han descrito más de 100 tipos de VPH que se dividen en virus de alto y de bajo riesgo, dependiendo de su relación con el CaCU. Los tipos 6 y 11 son ejemplos de virus de bajo riesgo que no causan cáncer, pero pueden causar verrugas en la piel, genitales, ano, boca y/o garganta. Los tipos 16 y 18 son ejemplos de virus de alto riesgo que están asociados con lesiones cervicales con evolución maligna (Cortés-Gutiérrez et al. 2010). En nuestra población se han encontrado co-infecciones de VPH 16 con otros subtipos virales por ejemplo VPH 31, 33 y 51, entre otros (Sánchez-Anguiano et al. 2006).

La infección por el VPH causa replicación continua y acelerada de la célula, lo que impide la maduración y diferenciación de la misma y esto a su vez es causante de inestabilidad cromosómica, la cual es otro de los factores asociados con la progresión de la lesión (Münger et al. 2004, Doorbar 2005). A nivel génico esta inestabilidad puede expresarse como pérdida de genes supresores de tumor, activación de oncogenes o generación de proteínas de fusión. A nivel citogenético se expresa por la ruptura de sitios alcalinos lábiles (Cortés-Gutiérrez et al. 2011), aneuploidías, rearrreglos cromosómicos, ciclos de ruptura-fusión y formación de micronúcleos (MN) (Leal-Garza et al. 2002), los cuales individualmente o en conjunto, pueden promover a la progresión del tumor.

En el caso específico del CaCU, se han encontrado mediante técnicas de citogenética convencional alteraciones en un gran número de cromosomas (Atkin 1997) específicamente se ha observado asociación entre el cáncer cervical y anormalidades del cromosoma 1 como deleciones, inversiones, duplicaciones, isocromosomas y translocaciones (Sreekantaiah et al. 1988). Otros estudios han reportado asociación

entre los VPH de alto riesgo y alteraciones numéricas del cromosoma 1 en neoplasia intraepitelial cervical (Bulten et al. 2002) y asociación entre los estadios de cáncer cervical y aneusomía del cromosoma 1 demostrada por hibridación *in situ* fluorescente (FISH) (Cortés-Gutiérrez et al. 2005). Más recientemente se reportó inestabilidad cromosómica específica en secuencias DNA satélite de 5 pb del cromosoma 1 en pacientes con neoplasia cervical mediante técnicas de detección de rupturas del DNA e Hibridación *in situ* Fluorescente (DBD-FISH) (Cortés-Gutiérrez et al. 2013) y en el cromosoma 3 (Heselmeyer et al. 2005).

Anteriormente se postulaba que las mutaciones presentes en el genoma se adquirirían de manera progresiva, pero recientemente, en el 2011, se describió un fenómeno llamado Cromotripsis (Chromothripsis ; *Chromo*: cromosoma, y *thripsis*: destrozado en piezas) en el que se propone que en una sola región cromosómica pueden ocurrir décimas o cientos de rearrreglos cromosómicos a partir de un solo evento catastrófico (“shattering”: rompimiento) seguido por un pegado de las piezas al azar (“stitching”: pegado) lo que da lugar a la formación de cromosomas derivados. Las células que pueden sobrevivir a ese evento están muy mutadas y esto les confiere una ventaja selectiva de la clona que promueve la progresión del tumor (Stephens et al. 2011).

Estudios iniciales muestran que la cromotripsis se encuentra en aproximadamente del 2-3% de todos los cánceres y presenta alta frecuencia en cánceres de hueso y hasta donde conocemos, no existen reportes de estudios en CaCU. Se piensa que la cromotripsis pueda jugar un papel importante durante el desarrollo normal humano, aunque el mecanismo no está del todo explicado y se requieren más estudios para entender el proceso (Maher y Wilson 2012). La cromotripsis se ha relacionado con mal pronóstico en algunos pacientes con padecimientos malignos o enfermedades con desarrollo de cáncer como neuroblastoma y mieloma múltiple (Raush et al. 2012).

En el presente trabajo estudiamos la inestabilidad cromosómica específica causada por el VPH en pacientes con neoplasia cervical y la asociamos con la presencia de cromotripsis.

2. JUSTIFICACIÓN

La importancia de este estudio radica en que el CaCU ocupa el cuarto lugar en incidencia a nivel mundial y el segundo en nuestro país. Se ha relacionado la presencia de la infección del VPH de alto grado con el desarrollo y progresión del CaCU así como con la inestabilidad cromosómica de la célula lo cual puede observarse con la utilización de técnicas de citogenética molecular. Los resultados obtenidos en este estudio nos pueden orientar a conocer el daño en regiones específicas en el DNA con el fin de en un futuro poder encontrar un biomarcador que pueda ser utilizado para predecir el pronóstico de la lesión, así como para asociar la infección del VPH con cromotripsis y brindarle al paciente algunas alternativas de tratamiento que no dañen su DNA pero que a su vez puedan eliminar las lesiones presentes. Los resultados además también podrán orientar a conocer el tipo de VPH más común en nuestra población que afecta regiones específicas del DNA asociado con cromotripsis, lo que puede brindar información en el desarrollo de nuevas vacunas contra el virus.

3. HIPOTESIS

El nivel de daño en secuencias específicas del DNA es mayor en el grupo de pacientes con neoplasia cervical que en el grupo control.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

El objetivo de este estudio de casos y controles es evaluar la inestabilidad cromosómica específica en las células epiteliales del cuello uterino en mujeres con carcinoma cervical mediante técnicas de citogenética molecular y asociar este daño con el tipo de VPH.

4.2 Objetivos Particulares

- 1) Evaluar y comparar el daño en regiones específicas de los cromosomas 1 y 3 (CEP 1, CEP 3, 1p36 y 3q26) en las pacientes con neoplasia cervical y un grupo control mediante las técnicas de citogenética molecular.
- 2) Asociar el daño encontrado en regiones específicas del DNA en las pacientes con neoplasia cervical con el tipo de VPH.

5. ANTECEDENTES

5.1 Epidemiología

El cáncer cérvico uterino (CaCU) es la cuarta causa de muerte a nivel mundial por neoplasias malignas en la mujer, con una incidencia de 526,000 nuevos casos y causando 266,000 defunciones reportadas en el año 2012. El 80% de los casos corresponden a países en vías de desarrollo (Figura 1) (Ferlay et al. 2012). Es considerada la enfermedad de transmisión sexual más frecuente en el mundo (Rivera et al. 2006).

En México, es la segunda causa de muerte después del cáncer de mama, con 13,960 nuevos casos y 4,769 defunciones en el 2012 (Ferlay et al. 2012). La mayoría de las mujeres que desarrollan este cáncer tienen entre 40 y 50 años de edad, sin embargo, cada vez es más común ver mujeres jóvenes infectadas y que a edades de 20 y 30 años se les diagnostica CaCU (López-Saavedra y Lizano-Soberón 2006).

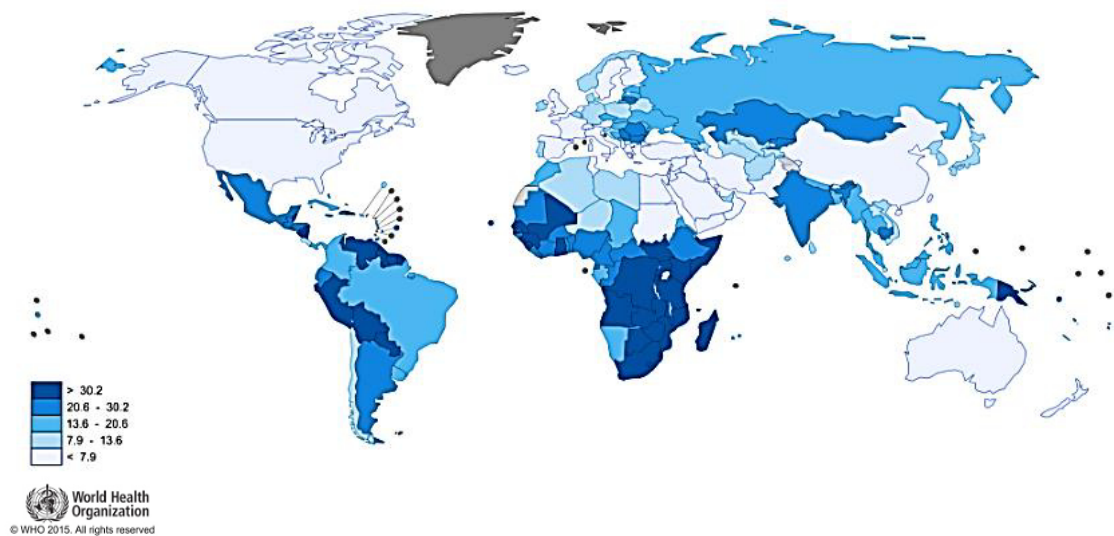


Figura 1. Incidencia de cáncer cérvico uterino a nivel mundial en el 2012. WHO Organización Mundial de la Salud 2015, Globocan 2012. Cifras por 100,000 habitantes. Tomada de <http://globocan.iarc.fr/> disponible en web.

5.2 Historia

Por mucho tiempo se sospechó una etiología infecciosa para las verrugas, esto se demostró en el siglo XIX. Uno de los primeros reportes de transmisión de verrugas en humanos fue por un accidente ocurrido en 1845 a un fabricante de velas de cera, que mientras estaba removiendo un condiloma acicular con su instrumento se lastimó debajo de la uña. Tiempo después apareció una verruga en el lugar de la lesión, que luego de destruirla repetidamente reaparecía, hasta que la uña fue finalmente removida. En otro experimento, el investigador Ullmann inoculó extractos de papilomas laríngeos en heridas hechas por el mismo en su brazo. Después de 9 meses brotó una verruga en el sitio de inoculación (Ullmann 1923). Estos y otros experimentos concluyeron que las verrugas representaban enfermedades distintas causadas por un agente transmisible.

El concepto de que algunas verrugas pueden progresar a la malignidad fue establecido por los estudios de Shope, Rous y otros, que estudiaron la transmisión de verrugas que aparecen de manera natural en los conejos comúnmente llamados de cola de algodón. Estos investigadores descubrieron que las lesiones formadas en conejos domésticos, después de inocularlos con extracto de verrugas de los conejos de cola de algodón, eran sensibles a la progresión maligna (Shope 1933, Rous 1935). También se demostró que tales extractos causaban la aparición de verrugas solo en conejos y no en otros animales, lo que ilustra la especificidad del virus por su hospedero (Phelps 1987). El primer virus del papiloma fue aislado de conejos por Richard Shope en 1933 (Shope 1933).

El enlace entre el CaCU y el VPH fue demostrado a principios de los años 80's por el médico alemán Harald zur Hausen y se demostró que la infección por el virus es un requisito necesario para el desarrollo de esta enfermedad (Zur Hausen 1982). En el año 2008, el doctor zur Hausen, recibió el Premio Nobel de Medicina por este descubrimiento (López-Saavedra y Lizano-Soberón 2006).

5.3 Factores de riesgo para la infección

El riesgo de contraer un VPH genital está influenciado por la actividad sexual, por lo que el CaCU sigue un patrón típico de enfermedades transmitidas sexualmente. Los factores de riesgo para la infección son mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1. Factores de riesgo en el paciente para la infección de VPH.

Factor	Explicación
Promiscuidad	Existe fuerte asociación entre el número de parejas sexuales y la adquisición del VPH (Burk et al. 1996).
Actividad sexual a temprana edad	El CaCU es más común después de los 35 años, lo que sugiere infección a temprana edad y progresión lenta a cáncer.
Historial de otras enfermedades transmitidas sexualmente	Relacionado con la actividad sexual.
Verrugas genitales	Indican infecciones previas.
Pareja sexual con cáncer de cérvix o de pene	Aumenta el riesgo de contraer el virus.
Edad	La infección es más común en mujeres jóvenes sexualmente activas (18-30 años), después decrece la prevalencia (Adam et al. 2000, Burk et al. 1996).
Persistencia viral	Causa inmortalización de la célula por interacción de las proteínas virales con los puntos de control del ciclo celular (López-Saavedra y Lizano-Soberón 2006).
Uso prolongado de anticonceptivos orales	La región larga de control del virus contiene elementos de respuesta a glucocorticoides, inducibles por hormonas esteroidales como la progesterona (Negrini et al. 1996).
Co-infección con otros virus	Como el herpes simple (HSV) tipo 2, citomegalovirus (CMV), herpes virus humano tipos 6 y 7 (HHV-6), detectados en cérvix (López-Saavedra y Lizano-Soberón 2006).
Carga viral	Correlaciona directamente con la severidad de la enfermedad. VPH 16 puede alcanzar carga viral más alta que otros tipos virales.
Predisposición genética	Representa el 27% del efecto de los factores subyacentes para el desarrollo del tumor. La herencia afecta la susceptibilidad a la infección por VPH, la capacidad para resolverla y el tiempo de desarrollo de la enfermedad (Magnusson et al. 2000).
Uso de tabaco	Existe fuerte asociación en el consumo de tabaco y mayor riesgo de infección por el VPH (Chacón et al. 2006).
Variantes virales intratipo	Las diferencias en la secuencia nucleotídica de la LCR y de los genes E2, entre variantes virales, podrían repercutir en funciones tales como modulación de la expresión de genes virales y replicación (López-Saavedra y Lizano-Soberón 2006).

5.4 Patología

5.4.1 Clasificación de las lesiones

Los cánceres invasores del cuello uterino vienen precedidos generalmente por una larga fase de enfermedades pre-invasoras. Existen varios sistemas de clasificación por patología de esas lesiones precancerosas. Uno de estos sistemas divide a las lesiones en diferentes grados de displasia o neoplasia intraepitelial cervical (NIC o CIN, según sus siglas en inglés) antes de progresar a carcinoma invasor. Estas lesiones se caracterizan microscópicamente por una serie de manifestaciones que van de la atipia celular a diversos grados de displasia que van desde leve, moderada y severa, clasificándolas en NIC 1, NIC 2 y NIC 3, respectivamente, según el grado de afectación de la capa epitelial por las células atípicas. El término carcinoma *in situ* (CIS) se introdujo en 1932 para denotar las lesiones en las cuales las células carcinomatosas indiferenciadas abarcaban todo el espesor del epitelio, sin interrumpir la membrana basal. Por muchos años, las lesiones precancerosas cervicales se notificaron usando las categorías de displasia y CIS, todavía ampliamente empleadas en muchos países en desarrollo (Richart 1990).

En los años ochenta fueron reconociéndose cada vez más alteraciones anatómo-patológicas como la atipia coilocítica o condilomatosa asociada con la infección por virus del papiloma humano. Los coilocitos son células atípicas con una cavitación o halo perinuclear en el citoplasma, que indica cambios citopáticos debidos a la infección por el VPH. En 1990, se propuso una terminología histopatológica basada en dos grados de la enfermedad y fueron denominadas Sistema Bethesda e incluye: Lesión intraepitelial de bajo grado (LIE-BG) (o LSIL por sus siglas en inglés), que comprende las anomalías compatibles con atipia coilocítica y las lesiones NIC 1, y Lesión intraepitelial de alto grado (LIE-AG) (o HSIL por sus siglas en inglés) que comprende NIC 2 y NIC 3. Se consideró que las lesiones de alto grado eran precursoras del cáncer invasor (Solomon et al. 2002). Este sistema de clasificación es el que se empleó para las lesiones de las pacientes en el presente estudio.

El CaCU de células escamosas es el más común, mientras que el 10 % de los casos son de origen glandular, es decir adenocarcinoma. Este también contiene VPH pero la correlación es menos pronunciada y es dependiente de la edad. Cerca del 50% de las mujeres con adenocarcinoma *in situ* (AIS) tienen también NIC y es a menudo

encontrado en pacientes que han sido operados por carcinoma escamoso. El adenocarcinoma invasor puede ser puro o mezclado con carcinoma de células escamosas, con lo que se denomina carcinoma adenoescamoso. La incidencia de estos cánceres aumenta en los países desarrollados sobre todo en mujeres jóvenes, se cree que esto puede deberse al incremento en el consumo de anticonceptivos orales (López-Saavedra y Lizano-Soberón 2006).

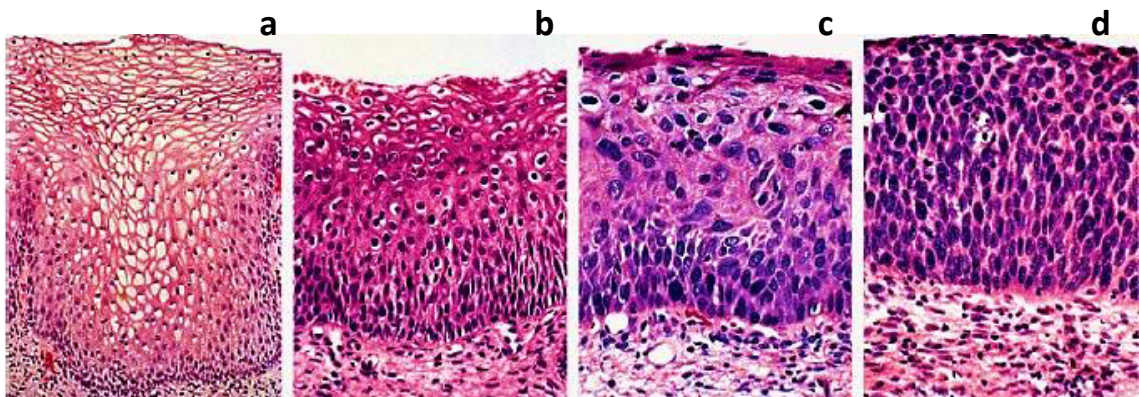


Figura 2. Clasificación de las lesiones de CaCU en el epitelio cervical. Biopsia de epitelio cervical con tinción de hematoxilina y eosina. a) Epitelio normal, b) NIC 1, c) NIC 2 y d) NIC 3 (Tomado de Richart 1990, disponible en web).

5.5 Diagnóstico

El diagnóstico del CaCU se realiza de manera combinada con los síntomas clínicos de la paciente y enviando muestras de raspado cervical a análisis al laboratorio. Las mujeres con cáncer de cuello uterino en etapa temprana usualmente no presentan síntomas, estos a menudo se observan, hasta que una lesión precancerosa se torna en un cáncer invasor y crece hacia el tejido adyacente. Cuando esto ocurre, los síntomas más comunes son: sangrado vaginal anormal, sangrado entre períodos menstruales, secreciones vaginales inusuales, dolor durante las relaciones sexuales. Se considera que un diagnóstico temprano de esta neoplasia, es potencialmente curable. Existen diferentes técnicas de diagnóstico del CaCU, a continuación se mencionan algunas de las más importantes:

5.5.1 Citología

La detección temprana y el tratamiento oportuno del VPH en lesiones precancerosas pueden prevenir la progresión a cáncer. El método principal de tamizaje entre la población es la citología de raspado cervical con tinción de Papanicolau. Es una

técnica de bajo costo y de aplicación masiva. Gracias a su implementación, aumentó la detección del CaCU en etapas tempranas disminuyendo la incidencia y la mortalidad por esa causa, tanto a nivel mundial como en nuestro país.

En estas preparaciones citológicas, se evalúan los cambios de cada célula para el diagnóstico y la clasificación de NIC. Las células displásicas siempre presentan distribución irregular de la cromatina, como en grumos. Los núcleos anormales en las células superficiales o intermedias indican una NIC de bajo grado (las figuras mitóticas y los nucléolos visibles son poco comunes en estos frotis), mientras que la anomalía de los núcleos de células parabasales y basales indica NIC de alto grado. El tamaño del núcleo respecto de la cantidad relativa de citoplasma (relación núcleo/citoplasma) es una de las bases más importantes para evaluar el grado de NIC. Las mayores relaciones se asocian con grados más avanzados de NIC. En general, en un frotis cervical se observan células con diversos grados de alteración, lo que conlleva muchas dificultades y una buena dosis de subjetividad al presentar los resultados. La experiencia del citólogo es sumamente importante en el informe final (Richart 1990).

5.5.2 Citología en base líquida

El frotis de Papanicolaou logra reunir entre 600.000 y 1.2 millones de células epiteliales cervicales y menos del 20% se transfiere al portaobjeto, el traspaso de células es aleatorio y sujeto a error si las células anormales no se distribuyen de forma homogénea por toda la muestra, debido a esto, en años recientes se desarrolló una variante de esta técnica que es la citología en base líquida. En esta técnica, la muestra que se obtiene de la paciente se introduce en su totalidad en un medio líquido, fijando las células y evitando la degeneración por aire. Toda la muestra es colocada en un portaobjetos, teñida y revisada por el citotecnólogo. Existen diferentes marcas comerciales que venden los kits para este estudio como ThinPrep® y Autocyte Prep® (Ricci 2004). Aunque su implementación es más costosa en el laboratorio, si se han observado diferencias en los diagnósticos entre la citología convencional y la de base líquida. Cheung y colaboradores en 2003, presentaron un estudio comparativo entre PAP convencional y tecnificado de base líquida. Para ello compararon, los datos de 191,581 PAP convencionales con 190,667 PAP de base líquida utilizando Thin Prep®. Con PAP de base líquida los resultados

insatisfactorios, se redujeron de 0.48% de la citología convencional a 0.32% de la base líquida (Cheung et al. 2003).

5.5.3 Colposcopia

La colposcopia es un procedimiento médico que consiste en la observación microscópica del epitelio del cuello uterino, paredes vaginales y la entrada a la vagina, que permite identificar lesiones precancerosas con gran precisión. El colposcopio es una especie de microscopio o lente de aumento que permite visualizar a mayor tamaño los tejidos y que sirve para detectar lesiones tanto benignas como malignas, además de que permite realizar con mayor exactitud y seguridad la prueba de Papanicolaou o toma de biopsias ante la presencia de lesiones sospechosas en el cuello uterino (Prendiville y Davies 2004, Leal-Garza y Cortés-Gutiérrez 1996).

5.5.4 Inspección visual con ácido acético y lugol

La inspección visual a simple vista del cuello uterino tras la aplicación de ácido acético al 5% (IVA) y/o solución de yodoyodurada de Lugol (IVL), son pruebas sencillas para detectar las lesiones cervicales precancerosas tempranas y el cáncer invasor temprano. Son técnicas que siguen empleándose en los consultorios de ginecología y displasias ya que son procedimientos rápidos y no invasivos. La IVA consiste en que durante la revisión ginecológica, se aplica en el cérvix de la paciente, una solución de 5% de ácido acético en áreas que el médico considera sospechosas de lesión (López-Saavedra 2006, Cortés-Gutiérrez 2002). Cuando las áreas de tiñen de blanco, se consideran positivas para lesiones intraepiteliales. Se cree que el ácido acético al 5% causa una coagulación o una precipitación reversible de las proteínas celulares. Si el epitelio contiene muchas proteínas celulares, el ácido acético coagula estas proteínas que puedan opacar el color del estroma (Prendiville y Davies 2004).

La IVL corresponde a la prueba de Schiller al yodo que se empleaba en los años 1930 y 1940 para detectar las neoplasias cervicales. Al contrario del ácido acético, al aplicar yodo las lesiones cancerosas positivas son aquellas que son yodo-negativas después de aplicar lugol, pues el epitelio de la NIC contiene escaso o ningún glucógeno, el yodo es glucofílico y, en consecuencia, la aplicación de una solución

yodada da lugar a la captación de yodo por los epitelios que contienen glucógeno (Prendiville y Davies 2004).

5.5.5 Biopsia

El diagnóstico final de NIC se establece por examen histopatológico de una biopsia cervical con sacabocados o una muestra de escisión, es la prueba *gold standard* para el diagnóstico de CaCU. Se observan las características histológicas de diferenciación, maduración y estratificación de las células y de las anomalías de los núcleos. Para clasificar la NIC se observa la proporción del espesor epitelial que presenta células maduras y diferenciadas. Los grados más avanzados de NIC suelen tener una mayor proporción del espesor epitelial con células indiferenciadas y solo una delgada capa superficial de células maduras, diferenciadas. Al realizar el diagnóstico se evalúan anomalías nucleares como la dilatación, la mayor relación núcleo/citoplasma, la hipercromasia, el polimorfismo y la variación del tamaño nuclear (anisocariosis). A menudo existe una fuerte correlación entre la proporción del epitelio que presenta maduración y el grado de anomalía nuclear. Las figuras mitóticas de las células en división son poco frecuentes en el epitelio normal y, cuando existen, se ven solo en la capa parabasal. Conforme se incrementa la gravedad de la NIC aumenta el número de figuras mitóticas, que pueden verse en las capas epiteliales superficiales. Cuanto menos diferenciado es un epitelio, más alto es el nivel en que pueden verse figuras mitóticas. Las configuraciones anormales de las figuras mitóticas también se tienen en cuenta al establecer el diagnóstico final (Richart 1990).

En la NIC 1 existe buena maduración, con mínimas anomalías nucleares y pocas figuras mitóticas. Las células indiferenciadas se encuentran en las capas epiteliales más profundas (tercio inferior). Se observan figuras mitóticas, pero no muchas. Pueden verse cambios citopáticos debidos a la infección por el VPH en todo el espesor del epitelio. La NIC 2 se caracteriza por cambios celulares displásicos restringidos sobre todo a la mitad o los dos tercios inferiores del epitelio, con anomalías nucleares más marcadas que en la NIC 1. Pueden verse figuras mitóticas en toda la mitad inferior del epitelio. En la NIC 3, la diferenciación y la estratificación pueden faltar por completo o existir solo en el cuarto superficial del

epitelio, con abundantes figuras mitóticas. Las anomalías nucleares aparecen en todo el espesor del epitelio (Richart 1990).

5.6 Otras metodologías diagnósticas para VPH

Existen diferentes métodos de laboratorio para detección del VPH. Estas metodologías son utilizadas en muestras que se obtienen de las pacientes en las revisiones clínicas. Entre ellas están: La hibridación *in situ* fluorescente (FISH), la captura de híbridos, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR o RCP), hibridación reversa, etc, que son técnicas que nos ayudan a determinar la presencia o ausencia del VPH, así como determinar el genotipo del virus, la carga viral, ente otras.

5.6.1 Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH por sus siglas en inglés), consiste en aplicar sondas de DNA complementarias a la secuencia que se desea estudiar marcadas con fluorescencia, que permitan su posterior visualización sobre un corte del tejido problema o sobre una extensión citológica. Requiere de equipo especializado como microscopio de fluorescencia e hibridador para llevarse a cabo, además de personal capacitado en el área. Existen algunas sondas para VPH comerciales que pueden utilizarse, sin embargo, están bajo categoría de investigación y aún no se emplean como diagnóstico. Además con esta prueba solo podríamos evaluar la presencia o ausencia del virus pero no la progresión de la enfermedad (Leal-Garza et al. 1996, Cortés-Gutiérrez et al. 2013).

5.6.2 Captura de híbridos

La captura de híbridos es una técnica en la que se utilizan sondas de RNA capaces de detectar varios tipos de VPH. Cuando la muestra presenta infección vírica se produce un híbrido RNA-DNA que es capturado por un anticuerpo específico contra híbridos y detectado mediante una reacción tipo ELISA que utiliza un compuesto quimioluminiscente para revelar la reacción y que proporciona incluso información sobre la cantidad de DNA viral presente en la muestra, que parece tener relación con la presencia de lesiones de alto grado. La técnica dispone de dos sondas: una para virus de bajo riesgo y otra para virus de alto riesgo, aunque una práctica habitual consiste en aplicar únicamente la sonda para detección de virus de alto riesgo, con lo

cual se reducen notablemente los costos. Se detectan cinco virus de bajo riesgo (6, 11, 42, 43, 44) y 13 tipos de riesgo alto o intermedio (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68). La captura de híbridos es la única aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos. Se requiere de equipo sofisticado y personal capacitado en el área (Chacóna et al. 2006).

5.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR punto final)

La reacción en cadena de la polimerasa (RCP o PCR por sus siglas en inglés) es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde. Tiene gran sensibilidad y esta depende de varios factores como los cebadores utilizados, la longitud del fragmento de DNA a amplificar, la sensibilidad del método de detección, etc. También depende de la calidad de la muestra cervical, esta no debe de contener sustancias que puedan inhibir la polimerasa. La PCR detecta la presencia del virus e identifica el genotipo exacto del virus, pero no puede predecir la progresión que tendrá la enfermedad. Existen múltiples juegos de cebadores que se pueden utilizar como el MY09-MY11, GP5-GP6, SPF10, dependiendo el tamaño de la región que se desee amplificar y el tipo de muestra a analizar. También existen kits como el VPH fast®, Genómica, S.A. que facilitan la realización de la prueba (Chacóna et al. 2006). Al igual que las metodologías anteriores requiere de equipo sofisticado con el cual no cuentan todos los laboratorios de diagnóstico y personal capacitado en el área.

5.6.4 PCR en tiempo real (Q-PCR)

La PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (en inglés Q-PCR: *quantitative polymerase chain reaction*) es una variante de la PCR punto final solo que a la mezcla de reacción se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo que se une al producto amplificado o bien sondas fluorescentes que son detectados con un termociclador especial que cuenta con sensores para medir fluorescencia. Esta medición, se realiza luego de cada ciclo de amplificación y esto permite conocer la cantidad de DNA sintetizado en cada momento, los resultados son generados en gráficas donde se representa la cantidad de DNA detectado por el ciclo de amplificación. Esta metodología también puede usarse para cuantificar RNA. Existen kits comerciales para detectar VPH como el HBRT-H14 de HybriBio® que detecta 14

tipos de VPH: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 (Chacóna et al. 2006).

5.6.5 Secuenciación

La secuenciación es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos en un fragmento o la totalidad del ácido nucleico. Existen equipos automatizados y kits en el mercado para realizarlo de manera comercial, sin embargo, su costo es alto para sugerirse como método diagnóstico. Tiene algunas ventajas como su gran sensibilidad y especificidad, se pueden detectar virus de alto y bajo riesgo y es recomendable como un método de monitoreo en pacientes tratadas ya que nos indica el tipo viral y se puede determinar si hay recurrencia o si se trata de una nueva infección. Sin embargo, no pueden detectarse co-infecciones, las cuales tienen una alta prevalencia en nuestra población y no es recomendable como método de tamizaje debido a su alto costo. No es una técnica cuantitativa de manera que no se puede establecer una carga viral, ni siquiera de manera relativa, para conocer el nivel de la infección.

5.6.6 Genotipificación del VPH

Existen kits en el mercado que nos ayudan a conocer el genotipo específico del virus, se basan en realizar una amplificación de una secuencia específica del VPH por PCR para su posterior detección. Uno de ellos es el kit de Extra INNO-LiPA HPV® Innogenetics el cual se basa en el principio de hibridación reversa. Primero se amplifican fragmentos de la región L1 del VPH usando cebadores SPF10 de los tipos virales más comunes de alto y bajo grado para su posterior hibridación en sondas inmovilizadas como líneas paralelas sobre tiras de membrana. Después de la hibridación y lavado se añade fosfatasa, que se une a cualquier híbrido formado biotinilado previamente. La incubación con el cromógeno se obtiene un precipitado de color púrpura y los resultados pueden interpretarse visualmente o utilizando el software HPV LiRAS® para LiPA. Con este kit se detectan hasta 28 genotipos diferentes de VPH (Inserto INNO-LiPA). Otro kit también comercial es el LINEAR ARRAY® HPV Genotyping Test con el que se detectan 37 tipos virales (Inserto Linear Array).

5.7 Tratamiento

El tratamiento de la paciente con CaCU, dependerá a la etapa de desarrollo en la que se encuentre la neoplasia. Existen varias opciones que pueden emplearse de manera sencilla o combinada con otras terapias.

5.7.1 Cirugía

En las etapas tempranas del CaCU, el tratamiento ideal es el quirúrgico. Los tratamientos varían desde la conización cervical hasta la histerectomía, como resultado se obtiene una curación del 99 al 100%. En el caso de las pacientes a quienes se les realiza histerectomía radical el porcentaje de curación llega a ser de 85% a 90%. Aquí se incluye la criocirugía que se utiliza para eliminar las células cancerosas congelándolas con una sonda de metal enfriada con nitrógeno líquido (Richart 1990).

5.7.2 Conización

Es un procedimiento terapéutico-diagnóstico mediante el cual se practica en el cuello uterino una incisión en forma de cono, para que sea estudiada por anatomía patológica para corroborar el diagnóstico clínico de la paciente. La conización también se puede utilizar como opción de tratamiento ya que con esto se eliminan las regiones en las que el médico observa directamente la lesión.

5.7.3 Radioterapia

Es un tratamiento médico de algunas enfermedades que consiste en la utilización y la aplicación de todo tipo de rayos, especialmente los rayos X. Se aplican de 45-50 Gy a pelvis total dependiendo del tamaño del tumor y de si existe o no ganglios positivos. La frecuencia y dosis depende del diagnóstico de la paciente y si existe o no metástasis a otros órganos. La radioterapia postoperatoria se reserva para aquellas pacientes en riesgo intermedio o alto.

5.7.4 Quimioterapia

Es otro tratamiento médico que consiste en la aplicación de sustancias químicas al organismo. Es muy empleado en cáncer sobre todo cuando hay metástasis. Puede emplearse un solo químico o combinados como por ejemplo: Cisplatino: 50 mg/m², mas paclitaxel 170-175 mg/m² cada 21 días por seis ciclos. El tipo de medicamento utilizado y el número de ciclos dependerá del diagnóstico de cada paciente.

5.8 Prevalencia, Regresión y Persistencia

La prevalencia de infección por VPH en el mundo va de un 2-44% (Bosh y de Sanjose 2003) y es más alta en mujeres jóvenes, decayendo conforme aumenta la edad (Schiffman 1992). Además la incidencia de la infección con tipos virales oncogénicos parece ser más alta que aquella con tipos virales no oncogénicos (Franco et al. 1999, Giuliano et al. 2002). La mayoría de las lesiones leves o moderadas revierten espontáneamente en pacientes inmunocompetentes (Holowaty et al. 1999). Se sabe que más del 70% de las adolescentes sexualmente activas y mujeres jóvenes adquieren una infección por VPH. Sin embargo, la mayoría son transitorias y solo cerca del 25% desarrollan una LIE-BG. Después, solo del 20 a 40% de estas progresarán a lesiones intraepiteliales de alto grado LIE-AG. Esto significa que aquellas mujeres que en alguna ocasión adquieren un VPH, solo el 5 o 10% de ellas desarrollarán una LIE-AG, mientras que cerca del 90% de las mujeres infectadas no mostrarán evidencia alguna del tipo viral adquirido después de 12 a 36 meses (Hildesheim et al. 1994, Ho et al. 1998). Sin embargo, en aquellas pacientes con deficiencia inmune, heredada o inducida farmacológicamente, hay una fuerte tendencia para que la infección persista y malignice en caso de infección con VPH de alto riesgo. Si el virus permanece en forma latente, una mujer que parece haber tenido una regresión de su infección entre sus visitas de seguimiento estaría aún en riesgo de desarrollar alguna lesión asociada al VPH, fenómeno que se conoce como persistencia. Se ha encontrado que la infección con múltiples tipos virales de VPH está asociada con este fenómeno (Muñoz et al. 2003). Reportes anteriores sugieren que la infección múltiple está asociada con un mayor riesgo de progresión de la enfermedad (Bachtiary et al. 2002). No está claro si esto es debido a la susceptibilidad del hospedero, la interacción entre los virus o la probabilidad de progresión independiente en cada tipo viral.

5.9 Virus del Papiloma Humano

El VPH pertenece a la familia Papillomaviridae (de Villiers et al. 2004), están ampliamente distribuidos en la naturaleza e infectan específicamente epitelio escamoso en más de 20 especies de mamíferos, aves y reptiles. Más de 40 tipos de VPH pueden transmitirse fácilmente por contacto sexual directo, de la piel y de las membranas mucosas de personas infectadas a la piel y a las membranas mucosas de

sus parejas. Pueden transmitirse por contacto sexual vaginal, anal y oral. Otros tipos de VPH como el 6 y 11 son responsables de verrugas genitales (Prendiville y Davies 2004).

5.9.1 Clasificación de los virus

Los VPH con capacidad para infectar las mucosas del aparato genital se han clasificado en dos grupos, según el riesgo de producir cáncer: Los VPH de bajo riesgo (VPH-BR), no causan cáncer, pero pueden causar verrugas en la piel, genitales, ano, boca y/o garganta. Son virus de bajo riesgo los genotipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81. Los tipos 6 y 11 de VPH causan 90% de todas las verrugas genitales y papilomatosis respiratoria recurrente, una enfermedad que es menos común en la que tumores benignos crecen en las vías respiratorias que van de la nariz y la boca a los pulmones (Prendiville y Davies 2004).

Los VPH de alto riesgo (VPH-AR), son los genotipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82. Están relacionados con proliferaciones epiteliales en las superficies cutáneas y mucosas, que en caso de tornarse persistentes o repetitivas pueden desencadenar la formación de lesiones de tipo maligno causando cáncer cervical, de pene, buco-faríngeo, anal, entre otros. El VPH-16 es el tipo de alto riesgo más común encontrado en casi la mitad de todos los cánceres de cuello uterino (Prendiville y Davies 2004). A nivel mundial, los cinco VPH más frecuentes son los genotipos 16, 18, 51, 52 y 58. Estudios epidemiológicos han demostrado que en Europa los genotipos de VPH más comunes son el 16, 18, 31, 33 y 58 (Castaño 2012) y en población mexicana son el 16, 31, 33, 51 (Aguilar-Lemanrroy et al. 2015). Existen otros tres genotipos: 26, 53 y 66, que se han clasificado como de probable alto riesgo (Castaño 2012).

5.9.2 Biología molecular del VPH

La partícula viral del VPH tiene una cápside de 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros) con un diámetro aproximado de 55 nm. Los capsómeros están hechos por dos proteínas estructurales L1 en mayor proporción y L2. EL VPH es relativamente estable y debido a que no tiene envoltura, permanece infeccioso en un ambiente húmedo por meses. Su genoma consiste en una molécula de DNA circular de doble cadena de aproximadamente 8 kb. Se divide en 3 regiones: Región larga de

control LCR que no contiene marco de lectura, la región que corresponde a las proteínas tempranas (E1 a E8) y las proteínas tardías (L1 y L2) (López-Saavedra y Lizano-Soberón 2006) (Figura 3).

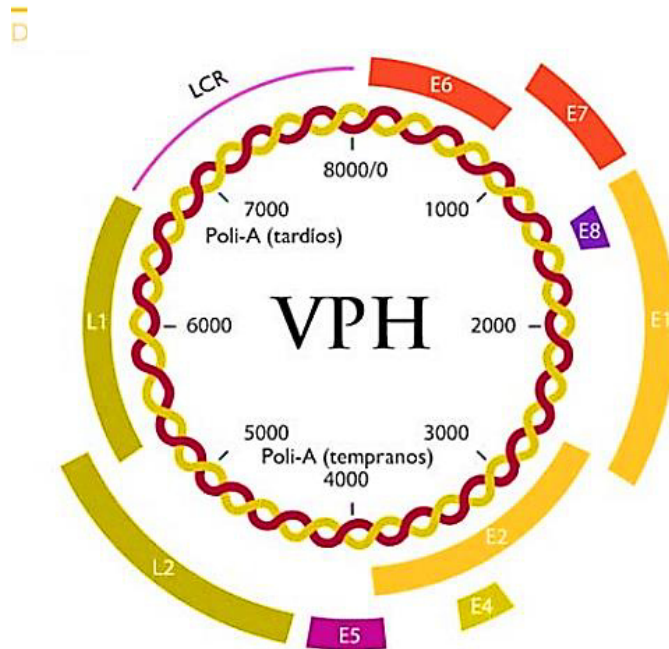


Figura 3. Genoma del VPH. Es una molécula de DNA circular de doble cadena dividida en 3 regiones: LCR, Región temprana que contiene los genes E1 a E6 y Región tardía que contiene los genes L1 y L2. Modificado de López-Saavedra y Lizano-Soberón 2006.

5.9.3 Región larga de control (LCR)

La región larga de control es un segmento genómico que tiene múltiples elementos de respuesta en *cis* que gobiernan la expresión génica y la replicación viral. El tamaño varía según el tipo viral. La LCR puede dividirse en 3 partes: el promotor temprano, el amplificador o “*enhancer*”, de alrededor de 230 pb y la región más alejada del 5'. Numerosos factores, celulares y virales, interaccionan con esta región como por ejemplo: las proteínas virales E1 y E2, modulan la actividad transcripcional y la replicación del virus; componentes de la maquinaria basal de transcripción como SP1 y TBP; receptores de glucocorticoides que modulan positivamente la transcripción, así como otros factores que parecen intervenir en la especificidad por el tejido como KRF, Skn – 1a/i, TEF, AP1, etc. (Bouallaga y Thierry 1999). Los VPH infectan solo a los tejidos epiteliales de la piel y mucosas, fijándose primero a proteínas como integrina α -6 y heparán-sulfato (Evander et al. 1997, Giroglou et al. 2001, Yoon et al. 2001). El promotor temprano, responsable de

la transcripción de los oncogenes virales, es activo en células de tejido de cáncer cervical o en los queratinocitos de la piel. Sin embargo, no es activo en las células epiteliales del hígado (HepG2) o del seno (MCF7). Esta especificidad por el tejido, no muy común en muchos virus, corresponde al amplificador transcripcional o “*enhancer*”. Se conocen diversos factores proteicos de las células epiteliales asociados a la actividad transcripcional del promotor, que pertenecen a familias de proteínas cuyos miembros se hallan en diferentes cantidades en los diferentes tipos celulares (Thierry et al. 1992, Bouallaga et al. 2000, Buta et al. 1993, Morris et al. 1993, Hoppe-Seyler et al. 1991, Apt et al. 1993). El complejo proteico que se ensambla en el “*enhancer*”, conocido como el “*enhanceosoma*”, interacciona con las proteínas del aparato basal de transcripción, que se unen en la región promotora hacia el extremo 3’ del LCR, aumentando de esta manera la actividad transcripcional del promotor y por ende la expresión de los genes tempranos (Bauknecht et al. 1995, Dong et al. 1994, May et al. 1994).

5.9.4 Proteína E6

Esta proteína de casi 150 aminoácidos con un peso molecular de 16 a 18 kDa es sintetizada por el gen E6, de aproximadamente 450 a 500 pb. La proteína tiene un potencial oncogénico débil en algunas líneas celulares y coopera con E7 para la plena capacidad transformante e inmortalizante. E6 es de las que se expresan muy tempranamente durante una infección por VPH. Esto le confiere varias funciones que alteran el ambiente celular, como por ejemplo el bloqueo de la apoptosis mediante la degradación de p53, la alteración de la transcripción de genes celulares a través de la interacción con p300 y CBP, e incremento de la vida celular por la sobre activación de la telomerasa. La acción clave de E6 de los VPH de alto riesgo (E6 – AR) es inhibir la función de p53, una proteína supresora de tumores, mediante su degradación por la vía de la ubiquitina (Hengsterman et al. 2001, Mantovani et al. 2001). Para ello E6 requiere a la proteína celular asociada a E6 (E6-AP). Esta proteína reemplaza a mdm2, que en células normales no infectadas es quien degrada a p53 (Figura 4). Este cambio reduce dramáticamente la vida media de p53 (desde 3 horas hasta 20 minutos) y el nivel de proteína en las células de CaCU a menos de la mitad del nivel presente en las células normales. La mayoría de las proteínas E6 de los VPH de bajo riesgo (E6 – BR) no se unen a p53 o lo hacen débilmente y no lo degradan. E6 también puede retener a p53 en el citoplasma bloqueando su

translocación al núcleo y así inhibiendo su función independientemente de su degradación (Mantovani y Banks 1999). En consecuencia E6 inhibe la capacidad de p53 para activar o reprimir la transcripción de sus genes blanco. E6 puede superar la apoptosis dependiente e independiente de p53. Con respecto a esto último, se ha visto que E6 interactúa con Bak, una proteína proapoptótica que se expresa en altos niveles en las capas superiores del epitelio en diferenciación (Krajewski et al. 1996). El incremento de p53, que se daría por la proliferación inducida por el VPH, así como la consecuente inducción de apoptosis, probablemente mataría a una célula infectada por VPH antes de que la replicación de este ocurriera. Por tanto, la modulación de los niveles de p53 por parte de E6 es importante para una infección productiva. En la figura 4, se resume la interacción de E6 con otras proteínas celulares, que se ha establecido gracias a nuevos estudios en el tema, así como las posibles consecuencias funcionales que le puede acarrear a la célula (Munger et al. 2001).

5.9.5 Proteína E7

La proteína E7 de aproximadamente 100 aminoácidos con un peso molecular de 10 kDa, es codificada por el gen E7, de aproximadamente 300 a 320 pb. E7 tiene la mayor capacidad transformante y actúa mediante la unión a proteínas celulares supresoras de tumores de la familia pRB, que a su vez interactúan con factores de transcripción de la familia E2F. La familia pRB controla la replicación celular (Boyer et al. 1996). La unión de E7 a la forma activa de pRB conduce a la liberación de los factores de transcripción E2F independientemente de la presencia de factores de crecimiento externos, lo que promueve el progreso de la fase S del ciclo celular y por tanto la replicación celular (Figura 4) (Munger et al. 2001). E7 también se asocia con otras proteínas tales como desacetilasas de histonas, AP1 e inhibidores de los complejos CDK, como p21 y p27. Como resultado de la liberación de E2F se expresa ciclina E, importante para el progreso de la fase S. Estas interacciones inducen múltiples respuestas celulares, incluyendo la estabilización de p53 que normalmente contrarrestaría esta replicación celular, anormalmente estimulada, mediante el incremento de la apoptosis. Sin embargo la proteína E6 – AR degrada a p53 y por tanto bloquea esta respuesta celular. En la figura 4 se resume la interacción de E7 con otras proteínas celulares y las posibles consecuencias funcionales que le puede acarrear a la célula (Munger et al. 2001).

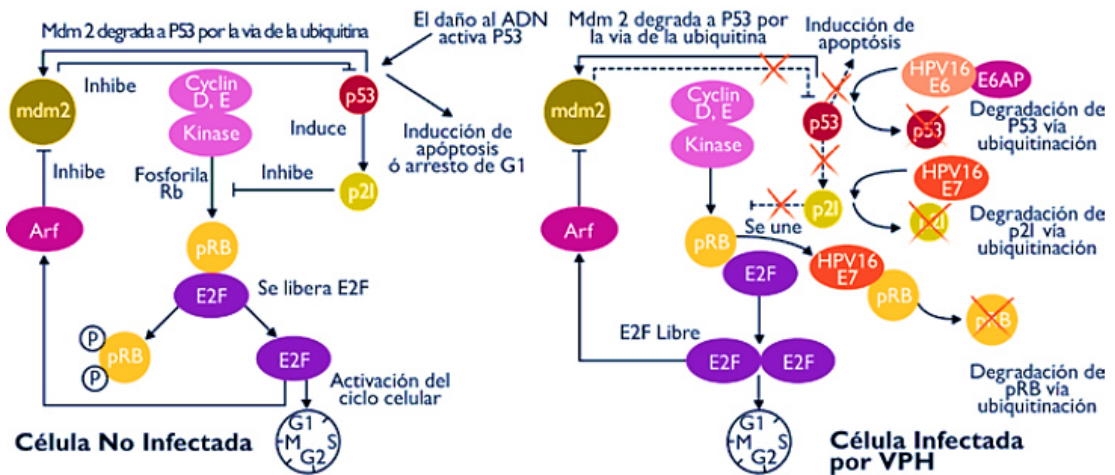


Figura 4. Interacción de E6 y E7 en el ciclo celular. (Tomada de López-Saavedra y Lizano-Soberón 2006).

5.9.6 Proteínas L1 y L2

La proteína L2, de 43 a 53 kDa, es la minoritaria de la cápside viral, que como L1, se produce en células que expresan E4 (Doorbar et al. 1997). La proteína mayoritaria L1, de 57 kDa y que conforma cerca del 80 % de la cápside, se expresa después de L2. La cápside contiene 360 copias de L1 y aproximadamente 12 copias de L2, organizados en 72 capsómeros de una partícula icosaedral. La proteína L2 se acumula en estructuras nucleares conocidas como dominios oncogénicos de la proteína de leucemia pro-monocítica (PML) durante el ensamble del virus y atrae a L1 hacia estos dominios. Se ha sugerido que estos cuerpos PML son el sitio de la replicación del DNA viral (Day et al. 1998) y que las proteínas de la cápside se acumulan en este sitio para facilitar el empaquetamiento.

5.10 Ciclo viral

5.10.1 Ingreso a la célula

Para que el VPH ingrese a las células se debe de llevar a cabo un micro-trauma en el epitelio genital, probablemente durante la actividad sexual, en particular en la zona de transformación del epitelio cervical, esto permite la exposición de las células basales en activa proliferación al VPH. Posteriormente ocurre la unión entre el receptor de la célula basal con la proteína de la cápside viral L1 a nivel de su extremo carboxi terminal. Dicho receptor ha sido asociado estructuralmente con heparán-sulfato para los tipos virales 16 y 33 y con alfa-6-Integrina para VPH 6. Una vez

unido el virus a la superficie celular, se produce su internalización al citoplasma de la célula huésped, proceso que ha sido identificado como endocitosis (Rivera et al. 2006, Woodman et al. 2007). Se reconocen dos sistemas de internalización del virus; el primero involucra un complejo proteico llamado Clatrina (Kirchhausen et al. 2000, Day et al. 2003), utilizado por los tipos 16 y 18; el segundo, utiliza un grupo de proteínas principalmente Caveolina, denominado endocitosis por caveolas, en el que participa el VPH 31 (Anderson et al. 1993). Posterior a la endocitosis, existe evidencia en modelos de infección por partículas virales tipo 11 y 16 que la cápside viral de 55 nm de diámetro experimenta degradación en el citoplasma celular, a través de un proceso de reducción química que daña los puentes disulfuro que estabilizan la cápside, originando capsómeros y monómeros, los cuales son transportados al núcleo junto a pequeños fragmentos del DNA viral, pudiendo atravesar los poros nucleares de un diámetro aproximado a 39 nm, con ello el genoma viral y las proteínas de la cápside participarían en los procesos de transcripción génica, replicación del DNA y maduración de viriones. Es posible definir una población viral no productiva, localizado en el estrato basal, en la cual se mantiene la replicación del DNA viral en un número de copias bajo (30-50 copias por célula infectada), en forma extracromosómica, llamados episomas que se estructuran en base a histonas y material genético (Figura 5). Se postula que durante esta etapa se asegura que el DNA viral se distribuya difusamente por las células basales proliferantes y que al mantener un número reducido de copias se impediría la activación de la respuesta inmune (Li et al. 1998). Las células basales proliferantes migran a los estratos parabasal y espinoso, amplificándose la expresión de genes virales tempranos a través de la región no codificante (URR), los cuales permiten producir DNA a cientos de copias por célula; ésta etapa en el ciclo viral es conocida como la fase vegetante, proliferante o productiva (Ling Peh et al. 2002).

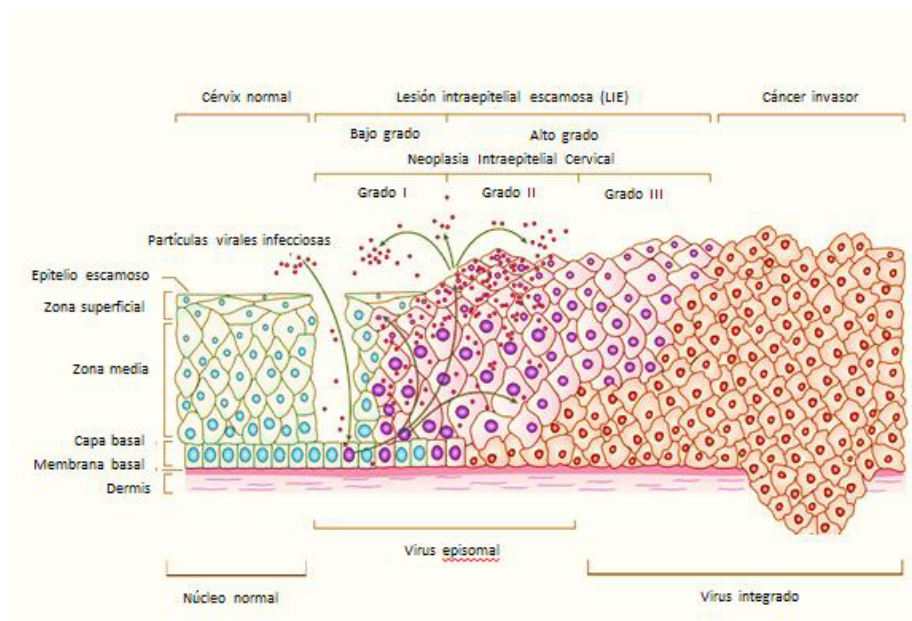


Figura 5. Etapas de infección por el VPH. El virus infecta a las células de la membrana basal del epitelio escamoso, para permanecer en estado episomal para posteriormente migrar a las células más superficiales donde puede o no integrarse al DNA celular. (Modificado de Woodman et al. 2007).

5.10.2 Mantenimiento del Genoma

Después de la infección y desensamble en las células basales y para mantener su genoma episomal en bajo número de copias, se expresan las proteínas E1 y E2 que además facilitan la segregación correcta de los genomas durante la división celular (Woodman et al. 2007, Wilson et al. 2002). En VPH 31, en líneas celulares epiteliales, se ha visto que si hay una falla para expresar E1, se pierde el estado episomal y el genoma viral se integra al de la célula. La infección inicial es seguida por una fase proliferativa que conduce al incremento del número de células basales que contienen el genoma viral, lo que puede requerir la expresión de las proteínas E6 y E7 que estimulan el progreso de la fase de ciclo celular G1 a S (Frattini et al. 1996).

5.10.3 Fase proliferativa

La expresión de E6 y E7, de un RNAm bicistrónico bajo el control del promotor temprano en la LCR, evita que la célula basal interrumpa el ciclo celular una vez que esta migra al estrato suprabasal del epitelio. Estas proteínas retardan la diferenciación celular y promueven la proliferación mediante interacciones con proteínas celulares

responsables del control del ciclo celular (López-Saavedra 2006, Woodman et al. 2007).

5.10.4 Amplificación del genoma y síntesis de los viriones

Para que se produzcan viriones infecciosos, los VPH deben amplificar su genoma y empaquetarlo en la partícula proteica. Esto ocurre en las capas superiores del epitelio, en el estrato espinoso, donde aumenta la actividad transcripcional del promotor tardío dependiente de la diferenciación. Este promotor se encuentra en el marco de lectura del gen E7 y promueve la transcripción de proteínas involucradas en la replicación del DNA viral, tales como E1, E2, E4 y E5, así como las constituyentes de la cápside, L1 y L2. Para la replicación viral se necesita que E2 se una a la LCR y que promueva la unión de E1 en el sitio de origen de la replicación viral. El ensamble de las partículas virales ocurre en el estrato granuloso del epitelio y eventualmente las células infectadas se descaman de la capa superior de este. El virus es estable extracelularmente ya que es resistente a la desecación y puede ser transmitido directamente a otros individuos. Alternativamente las células infectadas permanecen en el ambiente antes de que el virus sea transmitido a una nueva superficie epitelial, como ocurre en virus que infectan superficies cutáneas. El VPH no es lítico y se ha sugerido que la proteína E4 contribuye al egreso del virus de las capas superiores del epitelio mediante el rompimiento de los complejos de citoqueratina (López-Saavedra 2006, Doorbar et al. 1991).

5.11 Inmunología

El VPH depende de la diferenciación de las células epiteliales para completar su ciclo de vida. Los virus se han adaptado a múltiples mecanismos para evadir la respuesta inmune del hospedero. Esto incluye la expresión de proteínas virales a altos niveles solo en las capas superiores del epitelio donde la vigilancia inmune es limitada y la liberación no lítica de los viriones sin viremia significativa. La infección persistente con el VPH conduce a un ambiente de inestabilidad genómica y supresión inmune local, que puede llevar tanto a la acumulación de alteraciones genómicas en la célula huésped, así como a la integración del genoma viral en el genoma huésped. Cuando estas alteraciones adicionales proporcionan una ventaja de crecimiento selectivo a la célula, la carcinogénesis puede sobrevenir. Estudios recientes de secuenciación del genoma/exoma y el análisis de metilación, han

descrito alteraciones genómicas y epigenómicas de cánceres asociados al VPH. Estos estudios exhaustivos han generado información novedosa acerca de cómo la integración de VPH puede conducir inestabilidad genómica y la progresión de la infección viral con el cáncer, así como aberraciones genómicas resaltados que pueden ser objeto de orientación en el tratamiento de los cánceres asociados al VPH (Rusan et al. 2015).

5.12 Prevención

La FDA ha aprobado tres vacunas para la prevención de la infección por VPH, las cuales contienen partículas semejantes al virus (VLP) formadas por proteínas de la cápside pero que carecen del DNA viral, por lo que no son infecciosas. Se ha descubierto que las VLP son muy inmunogénicas, lo que significa que ellas causan una gran producción de anticuerpos, esto hace que las vacunas sean altamente eficaces (FDA HPV vaccines disponible en web, Zhou et al. 1991, Kinbauer et al. 1992, Koutsky et al. 2002).

Las vacunas aprobadas son: Gardasil® (Merck & Co), Gardasil 9® (Merck & Co) (www.gardasil.com) y Cervarix® (GlaxoSmithKline) (www.glaxosmithkline/cervarix). Las tres vacunas previenen las infecciones por los VPH 16 y 18 de alto riesgo y que causan cerca de 70% de los cánceres de cuello uterino. Gardasil® es una vacuna cuadrivalente ya que protege contra la infección de cuatro tipos de VPH: 16, 18, 6 y 11. Los tipos 6 y 11 de VPH causan 90% de las verrugas genitales. Contiene 40 microgramos de VLP de los tipos 11 y 16, y 20 microgramos de los tipos 6 y 18 con el adyuvante hidroxifosfato sulfato de aluminio amorfo (225 µg). Gardasil 9® previene la infección de los tipos 16, 18, 6 y 11 además de otros cinco tipos de VPH de alto riesgo (31, 33, 45, 52 y 58) por lo que se dice vacuna nonavalente. Tanto Gardasil® como Gardasil 9® están aprobadas para su uso en hombres y mujeres entre 9 y 26 años de edad. Cervarix®, es una vacuna bivalente que se dirige a dos tipos de VPH 16 y 18. Contiene 20 µg de cada VLP más el adyuvante AS04 que es un lípido monofosforilado (MPL 500 µg) e hidróxido de aluminio (50 µg). Las tres vacunas se administran en una serie de tres inyecciones en tejido muscular por un periodo de 6 meses (Lineamientos para la aplicación de las vacunas de VPH en México, SS). Las vacunas actuales contra el VPH actúan como otras vacunaciones para proteger contra infecciones virales, estimulando al cuerpo

para que produzca anticuerpos contra el virus. Hasta la fecha, se ha establecido que la protección contra los tipos de VPH a los que están dirigidas dura por lo menos 8 años con Gardasil® y al menos 9 años con Cervarix®. No se conoce todavía la duración de protección con Gardasil 9®. Los estudios de larga duración que están todavía en curso sobre la eficacia de las vacunas ayudarán a los científicos a comprender mejor la duración total de la protección. En nuestro país la vacunación inició en el año 2006 y aún no se conocen resultados (Lineamientos para la aplicación de las vacunas de VPH en México, SS).

5.13 Inestabilidad Cromosómica

Se ha observado que además de la infección por el VPH existe otro factor determinante para que el CaCU pueda manifestarse, este factor es la inestabilidad cromosómica (Cortés-Gutiérrez et al. 2013). Este concepto se refiere a cambios en el genoma que pueden ser manifestados de diversas maneras a diferentes niveles, por ejemplo, a nivel cromosómico puede observarse formación de micronúcleos, aumento en el número de intercambio de cromátides hermanas, aneuploidías cromosómicas, alteraciones estructurales de los cromosomas, etc. A nivel génico lo podemos observar como activación de oncogenes, pérdida de genes tumor supresor, generación de proteínas de fusión, etc., los cuales individualmente o en conjunto promueven a la progresión del tumor (Stephens et al. 2011, Rusan et al. 2015).

En el caso del CaCU, se describió que existen alteraciones en diferentes cromosomas, utilizando técnicas de citogenética habitual en pacientes con cáncer cérvico uterino. El cromosoma 1, al igual que en otros tipos de cánceres, es el cromosoma que más frecuentemente se observa con múltiples rearrreglos aproximadamente en el 60% de los tumores. Los cambios incluyen pérdidas de brazos cortos y ganancias en brazos largos, isocromosomas, duplicaciones o translocaciones de brazos largos. Se ha observado que los pacientes con alteraciones en el cromosoma 1 tenían menor tiempo de supervivencia que los pacientes que tenían alteraciones en el cromosoma 6 y el cromosoma 11. Utilizando la técnica de FISH, se encontraron aneuploidías del cromosoma 1 en extendidos de raspado cervical de pacientes con CaCU (Atkin 1996).

Sreekantaiah y colaboradores en 1988, reportaron alteraciones en el cromosoma 1 en pacientes con carcinoma cervical, siendo la alteración más frecuente las deleciones

en 1q32 en el 41% de los casos. Las inversiones en 30 casos y la más común es aquella que involucra las bandas 1p36 y 1q32 (Bagchi y Mills 2008). En el caso de las duplicaciones, se observaron en 5 casos e involucraban segmentos variables del brazo largo. También se observaron isocromosomas del brazo corto del cromosoma 1 en 20 casos y del brazo largo en 34 casos. En 42 casos se observaron translocaciones involucrando los cromosomas 2, 3, 4, 5, 6, 10, 13, 14, 15, 16, 17 y 18 con puntos de ruptura variables (Sreekantaiah et al. 1988).

Bulten y colaboradores en 2002, encontraron una fuerte asociación entre las alteraciones numéricas del cromosoma 1 en pacientes con NIC con infección de VPH de alto riesgo utilizando técnicas de FISH, PCR y ensayo de hibridación (PCR-LiPA). Encontraron disomía en todos los epitelios normales y en el 36% de NIC 1. La tetrasomía fue encontrada en el 64% de NIC 1, 15% de NIC 2 y 17% de NIC 3. Se observó hipertetrasomía en el 77% de NIC 2, 83% de NIC 3 y en el 100% de los cánceres invasores. Los VPH de alto riesgo se encontraron en el 20%, 75% y 94% de lesiones disómicas, tetrasómicas e hipertetrasómicas respectivamente (Bulten et al. 2002).

En el 2005 Cortes-Gutiérrez y colaboradores encontraron asociación entre los estadios del cáncer cervical y la aneusomía del cromosoma 1 estudiando mujeres con diferentes etapas de CaCU y utilizando FISH con sondas centromérica específica del cromosoma 1. El VPH fue detectado por PCR y Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP's). Se determinó el OR (odds ratio) e intervalo de confianza (CI) para asociar la aneusomía con el diagnóstico y entre la aneusomía, se encontraron valores de OR de 2.00, 1.93, 6.12 y 8.53 entre NIC 1, NIC 2, NIC 3 y cáncer invasor respectivamente. El OR fue de 0.78 para VPH de bajo riesgo y 1.87 para VPH de alto riesgo (Cortés-Gutiérrez et al. 2005).

Las alteraciones estructurales en el cromosoma 3 están presentes en el 26% de los casos. Se han observado deleciones de brazos cortos y brazos largos. Se ha reportado también pérdida de heterocigocidad de 3q particularmente de 3q24-3q28 (Atkin 1996, Fields et al. 2016).

El cromosoma 5 se encuentra involucrado en diferentes alteraciones cromosómicas en el 77% de los carcinomas estudiados y la alteración más común es el isocromosoma de brazos largos del cromosoma 5 (Atkin 1996).

En el caso del cromosoma 11 se han descrito alteraciones en 37% de los carcinomas estudiados. Se observan deleciones, translocaciones, frecuentemente involucrando brazos cortos del cromosoma 11. Se ha reportado pérdida de heterocigocidad de 11p en el 42% de 43 tumores estudiados, por lo que se sugiere la presencia de un gen tumor supresor. También en 11q13 está el oncogen BCL-1 el cual tiene un papel importante en el ciclo celular. En el caso del cromosoma 17 se encontraron alteraciones en el 42% de los carcinomas analizados, como translocaciones de 17p e isocromosomas de 17q. Es bien conocido que el gen TP53 localizado en 17p13 puede ser inactivado en carcinomas cervicales (Atkin 1996).

Más recientemente y con el uso de otras metodologías, en el 2013, Cortés-Gutiérrez y colaboradores estudiaron el daño al DNA en secuencias específicas de 5pb del cromosoma 1 en pacientes con neoplasia cervical utilizando la técnica de DBD-FISH (DNA Breakage Detection-Hibridación *in situ* fluorescente). DBD-FISH es una técnica relativamente reciente que permite la detección y cuantificación de las rupturas en el DNA célula por célula. La muestra celular se coloca dentro de una capa de agarosa sobre un portaobjetos de vidrio, se eliminan las proteínas celulares y se incuban brevemente en una solución alcalina de que transforma las roturas del DNA en sitios de cadena sencilla (ssDNA). Después del lavado y deshidratación en baños de etanol, el microgel que contiene los nucleoides se colapsa y se seca, permitiendo de este modo hibridar los ssDNA de la muestra con sondas específicas marcadas con fluorescencia por la técnica de FISH (Cortés-Gutiérrez et al. 2005).

Las secuencias de DNA de 5 pb, son un tipo de secuencia de DNA satélite 3 en las que se repite el pentámero ATTCC, estas secuencias contienen un gran número de sitios lábiles alcalinos que están correlacionados con el grado de progresión de la neoplasia. Otro tipo de DNA satélite muy importante es el DNA alfoide ó Satélite alfa, en el que la secuencia repetida tiene un tamaño de 171 nucleótidos, y que forma parte del DNA de los centrómeros de los cromosomas humanos (Singh et al. 1988).

Cortés-Gutiérrez en el 2013, reportaron un alto grado de rupturas en las secuencias de DNA específicas de 5pb del cromosoma 1 en pacientes con LIE-AG y bajo números de rupturas en pacientes con LIE-BG, lo que sugiere que la progresión a transformación maligna involucra un incremento de inestabilidad en el cromosoma 1. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos donde muestran una

correlación positiva entre alteraciones numéricas y estructurales en el cromosoma 1 y los diferentes grados de lesiones. La presencia de esta inestabilidad de estas secuencias puede alterar a organización de la eucromatina y el medio ambiente nuclear después de la infección por el VPH lo que puede estar correlacionado con el fenómeno de cromotripsis (Cortés-Gutiérrez et al. 2013).

Por otra parte, la prueba del cometa es otra metodología para evaluar inestabilidad cromosómica, esta técnica evalúa daño del material genético célula por célula que es causado por diferentes agentes. El daño es representado por un aumento de fragmentos del DNA que migran fuera de las células del núcleo bajo una forma característica similar a la cola de un cometa; estos fragmentos son generados por rompimientos del DNA es muy similar a la técnica de DBD, con la adición de la electroforesis para la migración de los fragmentos (Cortés-Gutiérrez et al. 2012).

El ensayo del cometa sobre condiciones alcalinas, fue introducido por Sing y colaboradores en 1988, es útil para la detección rápida de rompimientos de cadenas simples de DNA y de lesiones sitios lábiles al álcali, entrecruzamientos del DNA (crosslinking) y en sitios de reparación del DNA por escisión en células *in vivo* e *in vitro* en muestras celulares muy pequeñas. Es una técnica aprobada por la FDA y es utilizada para validación de otros procedimientos.

Córtes-Gutiérrez y colaboradores en el año 2012, realizaron un trabajo con pacientes con diferentes estadios de CaCU y mujeres controles para evaluar la proporción del daño simple y doble en el DNA utilizando técnica de cometa alcalino y neutro respectivamente. En este trabajo se encontró un incremento significativo en el daño global al DNA, tanto daño simple (ssb) como daño doble (dsb). En las pacientes con LIE-AG se encontraron valores de 48.90 ± 12.87 y 23.50 ± 13.91 , en LIE-BG 33.60 ± 14.96 y 11.20 ± 5.71 y en controles 21.70 ± 11.87 y 5.30 ± 5.38 respectivamente. El coeficiente de correlación de Pearson reveló una fuerte relación entre los niveles de ssb y dsb ($r^2 = 0.99$, $P = 0.03$, y $r^2 = 0.94$, $P = 0.16$) respectivamente y la progresión a neoplasia. El incremento del daño doble fue confirmado por DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) sobre cometa neutro. Estos resultados sugieren inestabilidad en mujeres con neoplasia cervical lo cual está fuertemente

relacionado con la alta proporción de daño doble en el DNA (Cortés-Gutiérrez et al. 2012).

5.14 Cromotripsis

Cromotripsis (Chromothripsis ; *Chromo*: cromosoma, y *thripsis*: destrozado en piezas) es un fenómeno que propone que en una sola región cromosómica pueden ocurrir décimas o cientos de rearrreglos cromosómicos a partir de un solo evento catastrófico seguido por un pegado de las piezas al azar en zonas de microhomología lo que da lugar a la formación de cromosomas derivados (Figura 6). Existen pocos reportes de trabajos sobre cromotripsis el primero reportado fue por Stephens y colaboradores en el 2011 estudiando 746 líneas celulares de cáncer. Encontró que 18 de esas líneas celulares presentaban señales de cromotripsis (Stephens et al. 2011).

Magrangeas y colaboradores en el 2011, confirman la presencia de cromotripsis en mieloma múltiple y sugieren que podría estar asociada a pobre pronóstico del paciente. Raush y colaboradores en 2012 examinó el número de copias de 311 muestras de pacientes con leucemia mielocítica aguda (LMA) y encontró significativa asociación entre cromotripsis y pobre pronóstico (Magrangeas et al. 2011).

Existe evidencia en múltiples líneas celulares que soportan el modelo de un solo evento contra el sistema progresivo. Primero: el número de estados después de la cromotripsis es de dos estados. Bajo un modelo progresivo el número de estados debería de incrementarse durante la acumulación de los rearrreglos. Segundo: Las regiones con alto número de copias retienen la heterocigocidad después de la cromotripsis. Sin embargo, bajo un modelo progresivo una delección que ocurra tempranamente eliminaría el estado heterocigoto. Tercero: bajo un modelo progresivo se espera que haya una distribución al azar de los rearrreglos, en contraste con la cromotripsis en el cual los rearrreglos están en un solo sitio, lo que sugiere una localización espacial, sugiriendo un solo evento catastrófico (Stephens et al. 2011).

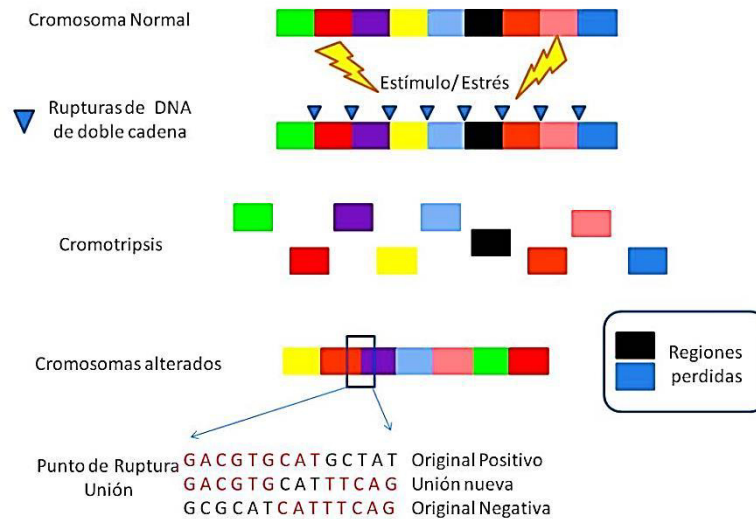


Figura 6. Mecanismo del fenómeno de cromotripsis. Un estímulo o estrés impacta a un cromosoma normal, esto hace que haya rupturas de doble cadena en la molécula de DNA con el posterior pegado de los fragmentos en zonas de micro-homología en diferente orden con o sin pérdida de regiones, lo que da lugar a la formación de cromosomas derivados, diferentes al cromosoma original (Modificado de Stephens et al. 2012).

Rausch y colaboradores en 2012, revelaron una asociación entre mutaciones en TP53 y cromotripsis en células germinales y somáticas en un paciente con Síndrome de Li-Fraumeni (LFS) y Sonic-Hedgehog (SHH-MB), y encontraron una firma de cromotripsis (Rausch et al. 2012). Dos estudios recientes sugieren que la cromotripsis puede contribuir también a variaciones estructurales en la línea germinal, lo que sugiere que los eventos catastróficos pueden ocurrir a lo largo del ciclo de vida de un organismo. En estos trabajos se encontraron duplicaciones y triplicaciones extras además de las inversiones y translocaciones previamente reportadas (Kloosterman et al. 2011 y Liu et al. 2011).

En otro trabajo Kloosterman y colaboradores en el 2011, estudiaron los rearrreglos genómicos provocados por la cromotripsis en cáncer colorectal primario y metastásico de 4 pacientes. Se identificaron 352 rearrreglos somáticos adquiridos y rearrreglos intercromosómicos (Kloosterman et al. 2011).

No está claro cuáles sean los factores que causen los rompimientos de doble cadena en el DNA pero pueden ser estímulos ambientales como radicales libres o radiaciones ionizantes que pueden servir de disparadores. El estrés replicativo

también puede servir de estímulo para la cromotripsis. Una perspectiva diferente es que la cromotripsis pueda ser causada por un mecanismo apoptótico. Las células que sobreviven a este evento pueden reparar el DNA e introducir rearrreglos cromosómicos nuevos. Hacen falta más experimentos para elucidar el mecanismo específico (Stephens et al. 2011).

No está claro cuál sea el mecanismo que una los fragmentos al azar. Un mecanismo propuesto es el NHEJ (Non-homologous end joining, Recombinación no-homóloga), en el cual se unen dos extremos de DNA con rompimientos de doble cadena, con la consecuente pérdida o ganancia de nucleótidos (Stephens et al. 2011). También han sido asociados los procesos replicativos Fork Stalling Template Switching (FoSTes) y Microhomology-mediated break-induced repair (MMBIR). Se ha observado que los fragmentos derivados de cromotripsis presentan microhomología en los puntos de ruptura el cual es totalmente al azar y basado en la proximidad espacial de los fragmentos. Las uniones en los puntos de ruptura revelan microhomología, pérdida de homología o pequeñas inserciones o deleciones, lo que soporta la idea del mecanismo de reparación NHEJ (Stephens et al. 2011, Forment et al. 2012).

Forment y colaboradores en el 2012 demostraron la replicación del DNA defectuosa o retrasada ocurre dentro del micronúcleo (Forment et al. 2012). Crasta y colaboradores en 2012 demostró que los micronúcleos generados de errores en la segregación mitótica, tienen replicación de DNA persistente. La replicación aberrante de DNA puede producir DNA dañado y mutagénesis o pulverización cromosómica dentro del micronúcleo. Los micronúcleos pueden persistir en las células por varias generaciones ya que el micronúcleo también puede ser distribuido a las células hijas. Los errores en la segregación de los cromosomas conducen potencialmente a mutaciones y rearrreglos cromosómicos que pueden integrarse posteriormente en el genoma. Como se observa durante la cromotripsis la partición de un cromosoma para formar el micronúcleo brinda una explicación del extenso daño al DNA restringido a un solo cromosoma (Forment et al. 2012, Crasta et al. 2012).

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron muestras de raspado cervical de pacientes con diagnóstico histopatológico de LIE-BG (n=9), LIE-AG (n=9) y mujeres sin ningún tipo de lesión cervical (n=9) provenientes de la Unidad Médica de Alta Especialidad No. 23, I.M.S.S.

6.1 Criterios de inclusión

Pacientes que acuden a consulta de primera vez en la clínica de displasias y con diagnóstico de neoplasia intraepitelial cervical en diferentes grados. Se les realizó un cuestionario ginecológico y firmaron carta de consentimiento informado.

6.2 Criterios de exclusión

Se excluyeron pacientes con tratamiento previos con radio o quimioterapia, pacientes fumadoras o bien con tratamientos largos con anticonceptivos. Muestras con presencia evidente de otro tipo de infecciones y muestras con escasa cantidad de células.

Las muestras fueron tomadas por el médico ginecólogo y transportadas inmediatamente en tubos estériles con buffer PBS al Laboratorio de Citogenética Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS para su procesamiento.

A las muestras de los pacientes se les realizaron las siguientes pruebas: DBD-FISH, cometa-FISH (para confirmar los resultados del DBD-FISH) y Tipificación de VPH por el kit de INNO-LiPA.

6.3 Cuantificación y viabilidad celular

Se cuantificaron las células epiteliales presentes en la muestra por observación directa sobre portaobjetos al microscopio de luz convencional y se ajustó a una concentración final de 10×10^3 células. Se determinó la viabilidad celular mediante el método de exclusión de azul de tripano: En un tubo cónico se colocaron aproximadamente 30 μ l de la muestra y se agregaron 10 μ l de solución de azul tripano (SIGMA®) 0.4%, incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos y gotear en un portaobjeto, colocar un cubreobjetos 22 x 22 mm y se observó al

microscopio de luz convencional. Se observó la cantidad de células teñidas de azul (células muertas) y células no teñidas. Se contó un total de 100 células y se determinó porcentaje.

6.4 Inclusión de las células en laminillas con agarosa

Se tomaron 30 µL de la suspensión de las células epiteliales del cuello del útero de cada una de las pacientes y controles y se mezcló con 50 µl de agarosa de bajo punto de fusión líquida al 1% mantenida a 37°C durante por lo menos 30 minutos. Se toman 30 µl de esta mezcla se depositan sobre un portaobjetos previamente cubierto con agarosa de bajo punto de fusión al 0.65 %, colocando inmediatamente un cubreobjetos de vidrio (22 mm x 22 mm) y dejar solidificar por 8 minutos a 4°C.

6.5 DBD-FISH (DNA Breaking Dispersion-Fluorescent *in situ* hybridization)

Esta técnica se realizó en base a la metodología propuesta por Cortés-Gutiérrez 2011. A las laminillas incluidas en agarosa se les retiraron los cubreobjetos y se trataron con una solución de 2 M de NaCl, 0.05 M de EDTA, Tris-base 0.4 M, y 1% de SDS (pH 7) a 43° C durante 25 minutos. Los portaobjetos se incubaron horizontalmente, para evitar la dispersión de la cromatina. Después de la eliminación inicial de proteína, los nucleoides restantes se lavaron en NaCl al 0.9% durante 10 minutos. Para generar ssDNA, las laminillas se incubaron en una solución alcalina que contiene NaOH 0.03 M y 1 M NaCl (pH 12.5) durante 2.5 minutos a temperatura ambiente. Después la muestra se neutralizó con 0.4 M Tris-HCl (pH 7.5) durante 5 minutos, los nucleoides se lavaron TBE 1X (Tris 89 mM, 89 mM de ácido bórico y EDTA 2.5 mM; pH 8.3) durante 2 minutos. Para estabilizar el ssDNA, los portaobjetos se deshidrataron en baños de etanol secuencial 70%, 90% y 100% durante 2 minutos cada uno y después se secaron al aire. Posteriormente las laminillas se hibridaron con sonda de genoma completo y sondas específicas.

6.6 Cometa

Esta metodología fue utilizada para validar los resultados obtenidos por la técnica de DBD-FISH. Se realizó en base a lo propuesto por Cortés-Gutiérrez y colaboradores en 2012 y se describe a continuación.

6.6.1 Cometa alcalino

Los cubreobjetos se retiraron suavemente y la laminilla se sumergió en solución de lisis que contenía 2 M NaCl, Tris-base 0.4 M, 1% de dodecil sulfato de sodio, y 0.05 M EDTA, a temperatura ambiente durante 30 min. Después de la eliminación de proteínas, los nucleoides resultantes se lavaron en buffer TBE (Tris 89 mM, 89 mM ácido bórico, EDTA 2,5 mM, pH 8.3) durante 10 min. Los portaobjetos se trataron con solución fresca alcalina (NaOH 0.03 M y 1 M NaCl 0.9%) durante 2.5 minutos, para escindir los sitios de álcali-lábiles. Las laminillas se colocaron horizontalmente en una cámara de electroforesis con buffer alcalino (NaOH 0.03 M, pH 13) y se sometieron a electroforesis usando un campo eléctrico de 23 V/cm durante 12.5 minutos. Después de la electroforesis, los portaobjetos se retiraron suavemente de la bandeja y se lavaron con tampón (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) neutralizar por 5 minutos y en TBE 1X por 2 minutos. Los portaobjetos se deshidrataron en baños secuenciales de 70%, 90% y 100% de etanol, 2 minutos cada uno y se secaron al aire. Por último, los portaobjetos se tiñeron con yoduro de propidio (1 mg/ml) en Vectashield® (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.).

6.6.2 Cometa neutro

El procedimiento es igual que para cometa alcalino, solo que la electroforesis se realiza después de la depleción de proteínas y en buffer neutro TBE 1X (pH=7) a 23 V/cm durante 2 minutos.

6.7 Controles negativos y positivos

Todos los experimentos incluyeron control negativo que fueron células de una muestra de una mujer sin cáncer y, control positivo de una muestra de una mujer sin cáncer pero sus células fueron tratadas con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a una concentración de 20 mM a 37°C durante 15 minutos, como control para producir daño simple y células tratadas con la enzima de restricción AluI para producir daño doble al DNA. La metodología se realizará en base a lo reportado por Cortés-Gutiérrez et al. 2011.

La sonda centromérica del cromosoma 8 (CEP 8) fue empleada como control de las hibridaciones de las otras sondas centroméricas (CEP 1 y CEP 3) basándonos en el reporte previo de Cortés-Gutiérrez et al. 2013 donde se observa que esta región

centromérica del cromosoma 8 no muestra tantos sitios lábiles alcalinos con la técnica de DBD-FISH.

6.8 Cometa-FISH

Las laminillas con cometa alcalino fueron hibridadas con sonda del cromosoma 1 para validar los resultados del DBD-FISH con la misma sonda. La metodología de hibridación se describe en el siguiente punto.

6.9 FISH (Hibridación *in situ* fluorescente)

Las pruebas de DBD-FISH y Cometa-FISH, tienen como base la aplicación de la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) la cual se utiliza para detectar secuencias específicas a nivel cromosómico o a nivel celular. Se emplean sondas de DNA marcadas con fluorescencia que son complementarias a la región que se desea detectar las cuales se unen por complementariedad de bases al DNA de la célula ya sea en regiones repetidas como centrómeros o telómeros o bien en genes específicos. Una vez unidas las sondas a las regiones específicas del DNA, se puedan visualizar en un microscopio de fluorescencia empleando filtros específicos para los fluorocromos utilizados.

Para las hibridaciones de secuencias específicas se emplearon las siguientes sondas de la marca Vysis® Inc., Sunnyvale, CA, EE.UU: CEP 1 (D1Z1, centromérica del cromosoma 1) marcada en rojo, CEP 3 (D3Z1, centromérica del cromosoma 3) marcada en rojo y CEP 8 (D8Z1, centromérica del cromosoma 8) utilizada como control, marcada en rojo y con las siguientes sondas de secuencia única: 1p36 Microdeletion Region Probe marcada en rojo, que tiene una sonda control 1ptel marcada en verde y 3q26.32 PIK3CA, marcada en verde. Las hibridaciones y los lavados post-hibridación fueron realizadas siguiendo las especificaciones del fabricante.

Para elaborar la sonda de genoma completo, primeramente se realizó extracción de DNA de sangre periférica de una persona normal con un kit comercial Wizard®, Promega siguiendo las instrucciones del fabricante. Este DNA se cuantificó en un Nanodrop (Jenway ® Genoma Nano, United Kingdom) y 1 µg de la muestra se

marcó con biotina-14-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (dUTP) utilizando un kit comercial de la mella NICK Translation, (Roche® Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, EE.UU.) y se sometió a amplificación y marcaje de las sondas en base a las instrucciones del fabricante. La sonda fue desnaturalizada a 73°C y colocada en el área diana del portaobjetos e hibridada a 37°C. Posteriormente se realizaron lavados con formamida al 50% 15 minutos, 2XSSC pH: 7.0 durante 8 minutos, Tween 4 durante 2 minutos. Se colocaron 80 µl del bloqueante del anticuerpo y se colocó un cubreobjetos de plástico. Las preparaciones fueron incubadas a 37°C durante 5 minutos. En oscuridad, se retiró el cubreobjeto y se colocaron 30 µl de anticuerpo correspondiente (si se marcó con biotina se coloca avidin rodamina y si se marcó con digoxigenina se coloca anti-digoxigenina). Se colocó cubreobjetos de plástico y se incubó a 37°C durante 25 minutos. Las laminillas fueron lavadas 3 veces 2 minutos en Tween 4. Se dejaron secar y se colocó una gota de Vectashield® medio de montaje (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.).

6.10 Análisis de las muestras al microscopio de fluorescencia

6.10.1 DBD-FISH

Todas las laminillas hibridadas se revisaron en un microscopio de fluorescencia Axiophot, Zeiss ® (Carl Zeiss, Göttingen, Alemania) equipado con tres filtros para visualizar emisiones fluorescentes verde (FITC), rojo (Texas red) y azul (DAPI). Se tomaron fotografías con los filtros de fluorescencia respectivos según el marcaje de la sonda. Las imágenes se registraron utilizando una cámara CCD en blanco y negro de 16 bits cámara AxioCam, Zeiss ® (Carl Zeiss, Göttingen, Alemania) en un formato TIFF de 12 bits. Se revisaron mínimo de 30 núcleos o los máximos posibles de las células del epitelio cervical de cada paciente de cada grupo de diagnóstico y mujeres controles, por cada tipo de sonda utilizada y se tomaron fotografías.

6.10.2 Cometa

Los portaobjetos se examinaron usando un microscopio de fluorescencia invertido (IX70; Olympus, Tokio, Japón) equipado con un filtro de excitación a 549 nm y un filtro de barrera en 590 nm y unido a una cámara de vídeo (Olympus, Tokio, Japón).

Se contabilizaron 100 cometas de cada mujer control y pacientes con LIE-BG y LIE-AG en base al criterio establecido por Cortés-Gutiérrez et al. 2012, se tomaron fotografías y se determinó porcentaje.

6.11 Análisis de imagen

Las fotografías fueron analizadas con el software de análisis de imagen: Image J 1.4.3.6.7 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU., 2012) (Rasband 1997). Las señales fluorescentes fueron delimitadas manualmente y se obtuvo un umbral (Threshold) de medición de las mismas. Todas las imágenes fueron analizadas bajo el mismo umbral de medición. El software calcula la densidad integrada (DI) de cada muestra que es la intensidad de la señal multiplicado por el área de la señal y lo expresa en valores numéricos.

6.12 Genotipificación de VPH por INNO-LiPA

La tipificación del virus se realizó mediante la utilización del kit de INNo-LiPA ® HPV Genotyping Extra, INNOGENETICS, con el cual se identifican hasta 28 diferentes genotipos del virus del papiloma humano por detección de secuencias específicas de la región L1 del virus. Los VPH que se detectan son: Bajo riesgo 6, 11, 40, 43, 44, 54 y 70 (Probables de bajo riesgo 69/71 y 74). Alto riesgo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 (Probables de alto riesgo 26, 53, 66, 73 y 82). Está basado en el principio de hibridación reversa. Primeramente se realizó una amplificación del DNA de las muestras a estudiar por PCR con los primers SPF10 Buffer, dNTP/dUTP mix, MgCl₂, NaN₃ 0.05% con Amplitaq Gold Polimerasa. La amplificación se inicia con descontaminación, 37°C por 10 minutos; posteriormente se realizan 40 ciclos de desnaturalización 94°C por 9 minutos; desnaturalización a 94°C por 30 segundos; alineamiento a 52°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 45 segundos; con una extensión final a 72°C durante 60 segundos. Se obtienen amplicones biotinilados que se desnaturalizaron por 5 minutos a temperatura ambiente (20°-25°C) e hibridaron con sondas específicas que están inmovilizadas sobre tiras de membrana a 49°C durante 1 hora en el baño de agua con agitación (80 rpm). Se realizaron dos lavados poshibridación con solución astringente (previamente calentada a 37°C) y se agitó por 10-20 segundos a temperatura ambiente. Se añadió fosfatasa alcalina conjugada con estreptoavidina a cada una de las tirillas y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos en agitación.

Posteriormente se incubaron a 49°C con el cromógeno con el cual se obtiene un precipitado púrpura que se observa como líneas marcadas en las membranas o tirillas. Los resultados se interpretaron visualmente siguiendo la guía sugerida por el fabricante.

6.13 Análisis estadístico

Los valores numéricos obtenidos del software fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis para investigar cualquier diferencia en DI entre las diferentes secuencias de DNA específicas analizadas. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo. Todos los análisis se realizaron utilizando IBM SPSS 20.0 para Windows ® (IBM Corp., Armonk, Nueva York, EE.UU., 2011).

El tamaño de muestra fue determinado en base a un estudio preliminar de 3 personas por grupo, mediante el paquete MINITAB V12.0 para ANOVA-One Way con un alfa de 1%, un poder estadístico de 99%, medias (transformación logarítmica base 10) de 7.82, 8.85 y 10.48 para control, LIE-BG y LIE-AG respectivamente.

Se incluyó un factor de corrección para determinar ploidías y aneusomías cromosómicas en base al criterio establecido por Eastmond et al. 1994 y empleado por Cortés-Gutiérrez et al. en el 2013 en muestras de raspado cervical y linfocitos de sangre periférica, en mujeres controles y pacientes con LIE-BG y LIE-AG, realizado FISH con sondas específicas para los cromosomas 1 y 9, sin encontrarse diferencia significativa entre los grupos estudiados. Lo anterior significa que el número de set haploide de cromosomas (ploidía) o bien la presencia o ausencia de cromosomas de 1 y 9 (aneusomía) presente en mujeres con lesiones neoplásicas no afecta estadísticamente los resultados obtenidos por DBD-FISH.

7. RESULTADOS

Se estandarizaron en el Laboratorio de Citogenética Molecular de Centro de Investigación Biomédica del Noreste, I.M.S.S, las siguientes metodologías: DBD-FISH, Cometa-FISH y genotipificación del VPH por el kit de INNO-LiPA. Así mismo se estandarizaron las hibridaciones con sonda de genoma completo y sondas específicas: CEP 1, CEP 3, CEP 8 y de secuencia única: 1p36/1ptel y 3q26.

7.1 Cuantificación y viabilidad celular

Todas las muestras fueron ajustadas a una concentración de 10×10^3 o lo máximo posible y con una viabilidad de $>95\%$.

7.2 Control positivo y negativo

Los resultados de los controles negativo y positivo para la técnica de DBD-FISH, se muestran en la figura 7.

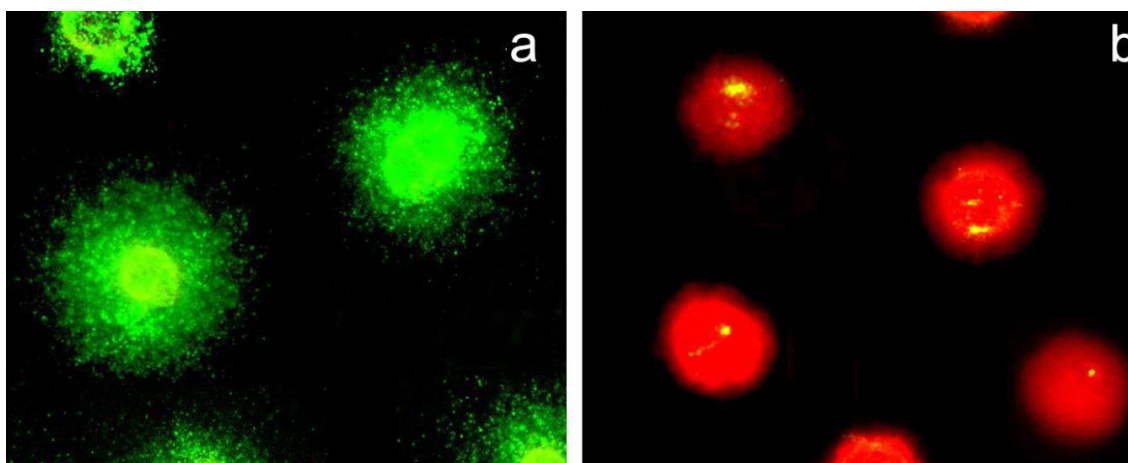


Figura 7. Controles positivo y negativo de la técnica de DBD-FISH. a) Control positivo: Células de raspado cervical de mujeres sin ningún tipo de lesión cervical con pretratamiento con H_2O_2 , sometidas a la técnica de DBD-FISH e hibridadas con sonda de genoma completo marcado en verde y contrastado con yoduro de propidio, se puede observar el daño severo causado por el H_2O_2 . b) Control negativo: Células de raspado cervical de mujeres sin ningún tipo de lesión cervical sometidas a la técnica de DBD-FISH e hibridadas con sonda de genoma completo marcado en verde y contrastado con yoduro de propidio, se puede observar el daño basal.

7.2.1 Sonda CEP 8

Se utilizaron muestras de células de raspado cervical de mujeres sin ningún tipo de lesión cervical (a), pacientes con LIE-BG (b) y LIE-AG (c), sometidas a la técnica de DBD-FISH e hibridadas con sonda centromérica del cromosoma 8 marcada en rojo. Se puede observar una señal discreta de hibridación en los tres grupos de mujeres estudiadas (Figura 8).

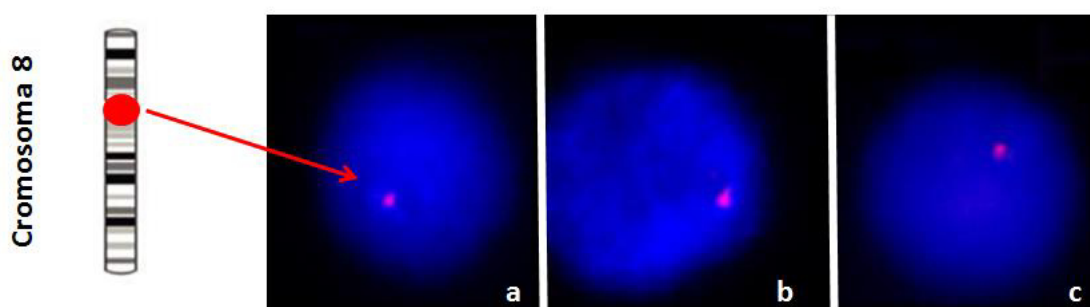


Figura 8. Células de raspado cervical después de tratamiento de DBD-FISH hibridadas con sonda centromérica del cromosoma 8 marcada en rojo y contrastado con DAPI-Antifade (azul). a) Control, b) Paciente con LIE-BG y c) Paciente con LIE-AG.

7.3 Pacientes

A continuación se muestran los resultados obtenidos por las diferentes técnicas de estudio en los tres grupos de pacientes y por cada sonda específica. Así mismo las lecturas de DI tomadas con el software de análisis de imagen.

7.4 Sonda de genoma completo

En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos después de someter las células de pacientes y controles a la técnica de DBD-FISH hibridadas con sonda de genoma completo marcada en rojo. Se encontró señal de hibridación discreta (marcaje basal) en las mujeres controles (a) y se observa incremento de la señal de hibridación en las pacientes con LIE-BG (b), y una señal muy incrementada en las pacientes con LIE-AG (c).

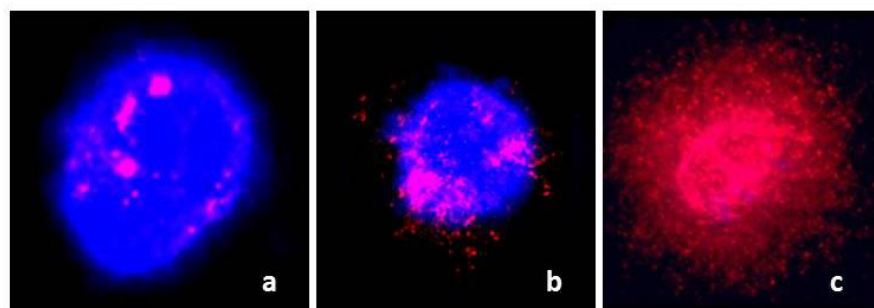


Figura 9. Células de raspado cervical después de tratamiento de DBD –FISH con sonda de genoma completo marcado en rojo y contrastado con DAPI-Antifade (azul). a) Control, b) Paciente con LIE-BG y c) Paciente con LIE-AG.

7.4.1 Análisis de imagen sonda de genoma completo

El análisis de imagen con el software Image J mostró un valor de 38×10^7 de densidad integrada (DI) de las mujeres controles analizadas, mientras que para las pacientes con LIE-BG mostró una DI de 926×10^7 y para las LIE-AG una DI de 4339×10^7 . El análisis estadístico muestra una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo con LIE-BG ($p < 0.05$) y diferencia significativa entre los grupos LIE-BG y LIE-AG ($p < 0.05$) (Tabla 2).

NEGATIVO≠LIE-BG≠LIE-AG

Tabla 2. Valores de DI obtenida por el Image J en las hibridaciones con sonda de genoma completo en las muestras de mujeres controles y pacientes con LIE-BG y LIE-AG.

Grupo	n (células)	DI
Control (-)	150	38×10^7
LIE-BG	150	926×10^7
LIE-AG	150	4339×10^7

7.5 Validación de resultados por la técnica de cometa

Los resultados anteriores fueron validados con la técnica de cometa alcalino y cometa neutro.

7.5.1 Cometa alcalino

En el caso del cometa alcalino en las mujeres controles se observaron los siguientes porcentajes de cometas: 70% basales, 9 % leves, 9% moderados y 12 % severos. En las pacientes con LIE-BG: 58% basales, 9 % leves, 10% moderados y 23 % severos y en las pacientes con LIE-AG: 42% basales, 9 % leves, 17% moderados y 32 % severos (Tabla 3) (Figura 10).

Tabla 3. Porcentaje de cometas alcalinos en las células cervicales de pacientes con CaCU y mujeres controles.

Cometas alcalinos (%)					
Diagnóstico	n (células)	Basal	Leve	Moderado	Severo
Control	100	70	9	9	12
LIE-BG	100	58	9	10	23
LIE-AG	100	42	9	17	32

7.5.2 Cometa neutro

Para el cometa neutro en las mujeres controles se observó la presencia de los siguientes tipos de cometas: 73% basales, 9 % leves, 9% moderados y 9 % severos. En las pacientes con LIE-BG: 61% basales, 9 % leves, 10% moderados y 20 % severos y en las pacientes con LIE-AG: 42% basales, 9 % leves, 17% moderados y 32 % severos (Tabla 4) (Figura 10).

Tabla 4. Porcentaje de cometas neutros en las células cervicales de pacientes con CaCU y mujeres controles.

Cometas neutros (%)					
Diagnóstico	n (células)	Basal	Leve	Moderado	Severo
Control	100	73	9	9	9
LIE-BG	100	61	9	10	20
LIE-AG	100	42	9	17	32

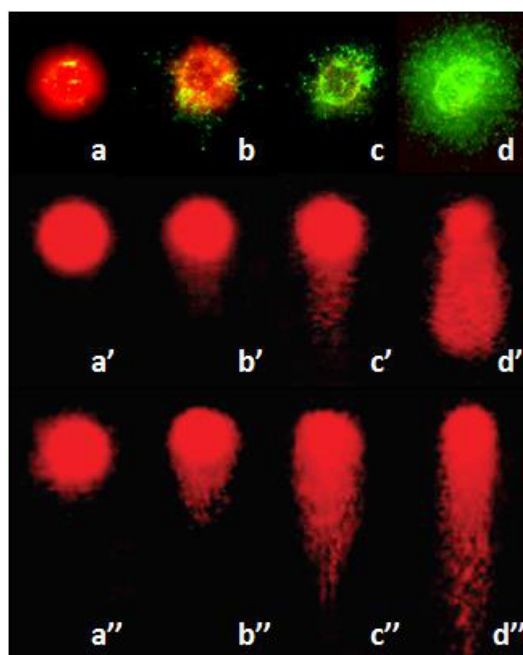


Figura 10. Validación de la técnica de DBD-FISH con cometa alcalino y cometa neutro. (a-d) DBD-FISH: Células de epitelio cervical sometidas a la técnica de DBD-FISH e hibridadas con sonda de genoma completo marcado en verde y contrastado con DAPI-antifade (azul). Se observa daño: a) Basal en mujer control, b) Leve en paciente con LIE-BG, c) Moderado en paciente con LIE-BG y d) Severo en paciente con LIE-AG. **(a'-d') Cometa alcalino.** El tipo de daño observado en el DBD-FISH corresponde al tipo de cometa: a') Basal, en mujer control, b') Leve en paciente con LIE-BG, c') Moderado en paciente con LIE-BG y d') Severo en paciente con LIE-AG. **(a''-d'') Cometa neutro.** a'') Basal, en mujer control, b'') Leve en paciente con LIE-BG, c'') Moderado en paciente con LIE-BG y d'') Severo en paciente con LIE-AG.

7.6 Sonda CEP 1

Los siguientes son resultados obtenidos después de someter las células de pacientes y controles a la técnica de DBD-FISH hibridadas sonda CEP 1 marcada en rojo en mujeres sin ningún tipo de lesión cervical (a), pacientes con LIE-BG (b) y pacientes con LIE-AG (c) (Figura 11).

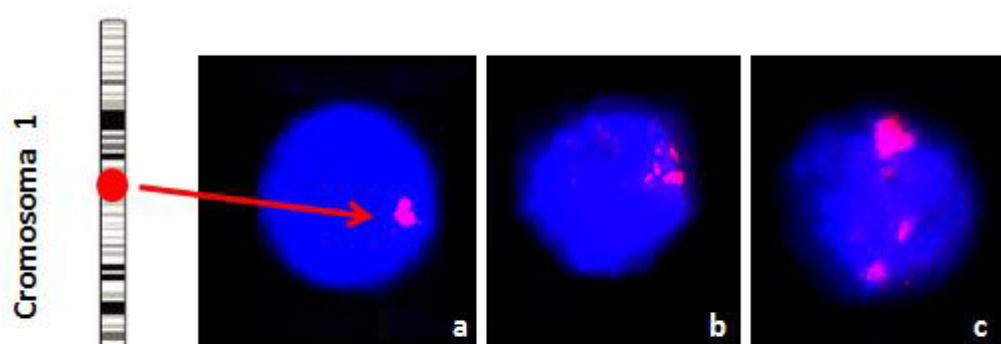


Figura 11. Células de raspado cervical después de tratamiento de DBD-FISH hibridadas con sonda centromérica del cromosoma 1 (CEP 1) marcada en rojo y contrastado con DAPI-Antifade: mujeres controles (a), Pacientes con LIE-BG (b) y LIE-AG (c).

7.6.1 Análisis de imagen CEP 1

El análisis de imagen con el software Image J mostró un valor de 1.65×10^4 de densidad integrada (DI) de las mujeres controles analizadas, mientras que para las pacientes con LIE-BG mostró una DI de 3.01×10^4 y para las LIE-AG una DI de 8.68×10^4 . El análisis estadístico muestra una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo con LIE-BG ($p < 0.05$) y diferencia significativa entre los grupos LIE-BG y LIE-AG ($p < 0.05$) (Tabla 5).

NEGATIVO≠LIE-BG≠LIE-AG

Tabla 5. Valores de DI obtenida por el Image J en las hibridaciones con sonda CEP 1 en las muestras de mujeres controles y pacientes con LIE-BG y LIE-AG.

Grupo	n (células)	DI
Control (-)	150	1.65×10^{-4}
LIE-BG	150	3.01×10^{-4}
LIE-AG	150	8.68×10^{-4}

7.7 Validación de resultados por Cometa-FISH

Los resultados anteriores fueron validados con la técnica de cometa-FISH con la sonda CEP 1 marcada en rojo. Los resultados se muestran en la figura 12. Se observa el daño basal obtenido en DBD (Figura 12 a) y confirmado por cometa en las mujeres sin ningún tipo de lesión cervical (Figura 12 a'). También se puede observar como el daño va incrementándose en las pacientes con LIE-BG en DBD-FISH (Figura 12 b y c) confirmado por cometa (Figura 12 b' y c') y en las pacientes con LIE-AG en DBD-FISH (Figura 12 d) y en LIE-AG (Figura 12 d').

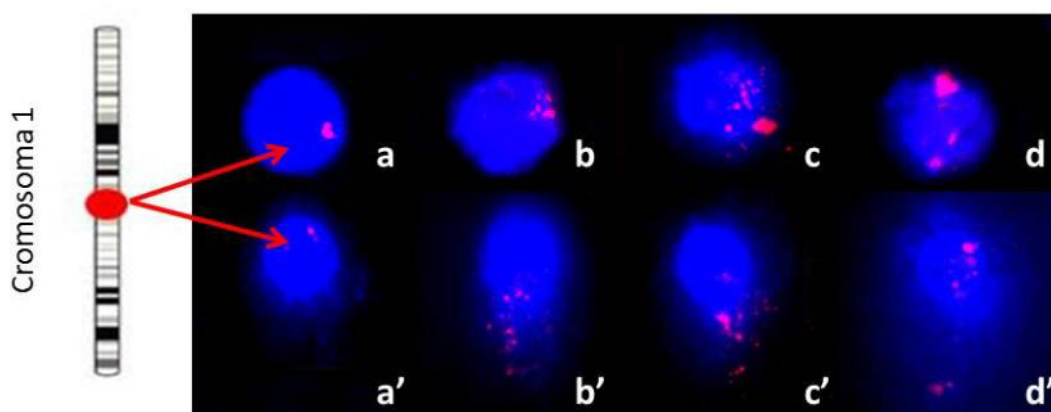


Figura 12. DBD-FISH y COMETA-FISH en células de raspado cervical. En la parte superior se muestran células de raspado cervical sometidas a la técnica de DBD-FISH e hibridadas con sonda centromérica del cromosoma 1 (CEP 1) marcada en rojo y contrastado con DAPI-antifade, donde se observa el daño: a) Basal en mujeres controles, b) Leve en pacientes con LIE-BG, c) Moderado en

pacientes con LIE-BG y d) Severo en pacientes con LIE-AG. En la imagen inferior se muestran células de raspado cervical sometidas a la técnica de cometa-FISH e hibridadas con sonda específica centromérica del cromosoma 1 (CEP 1) marcado en rojo y contrastado con DAPI-antifade, se pueden observar los diferentes tipos de cometas y la hibridación encontrada en cada uno de ellos: a') Basal, b') Leve, c') Moderado y d') Severo. Se considera como daño solamente las señales que se encuentran dentro del cometa.

7.8 Sonda CEP 3

En la figura 13 se muestran los resultados obtenidos al analizar las células de raspado cervical de controles y pacientes a la metodología de DBD-FISH e hibridarlos con sonda centromérica del cromosoma 3 (CEP 3): a) controles, b) pacientes con LIE-BG y c) pacientes con LIE-AG.

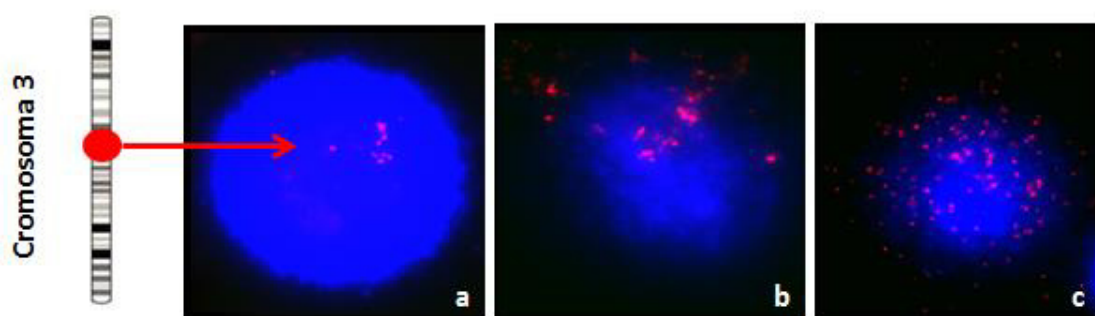


Figura 13. Células de raspado cervical después de tratamiento de DBD-FISH hibridadas con sonda centromérica del cromosoma 3 (CEP 3) marcada en rojo y contrastado con DAPI-Antifade: a) mujeres controles, b) Pacientes con LIE-BG y c) Pacientes con LIE-AG.

7.8.1 Análisis de imagen CEP 3

El análisis de imagen con el software Image J mostró un valor de 4.07×10^3 de densidad integrada (DI) de las mujeres controles analizadas, mientras que para las pacientes con LIE-BG mostró una DI de 4.6×10^3 y para las LIE-AG una DI de 11.2×10^3 . El análisis estadístico muestra diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los grupos de pacientes con LIE-BG y LIE-AG y no muestra diferencia significativa entre el grupo control y el grupo con LIE-BG (Tabla 6).

NEGATIVO=LIE-BG≠LIE-AG

Tabla 6. Valores de DI obtenida por el Image J en las hibridaciones con sonda CEP 3 en las muestras de mujeres controles y pacientes con LIE-BG y LIE-AG.

Grupo	n (células)	DI
Control (-)	150	4.07×10^3
LIE-BG	150	4.6×10^3
LIE-AG	150	11.2×10^3

7.9 Sonda de secuencia única 1p36/1ptel

En este caso la sonda de secuencia única 1p36 (marcada en rojo), viene incluido la sonda 1ptel (marcada en verde), con lo cual podemos contar con un control interno de la hibridación. En la figura 14, se puede observar el resultado de la hibridación con estas sondas en mujeres controles (a), pacientes con LIE-BG (b) y LIE-AG (c).

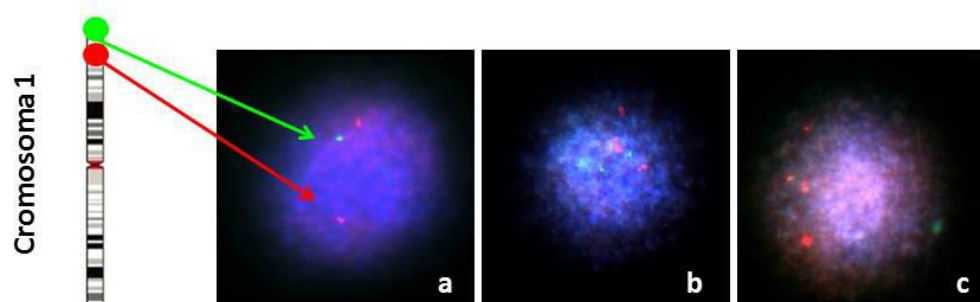


Figura 14. Células de raspado cervical después de tratamiento de DBD–FISH hibridadas con sonda de secuencia única 1p36 (roja)/1ptel (verde), contrastado con DAPI-Antifade. a) mujeres controles, b) Pacientes con LIE-BG y c) LIE-AG.

7.9.1 Análisis de imagen 1p36

Para la sonda 1p36 (roja), el análisis de imagen con el software Image J arrojó un valor de 4.76×10^3 de densidad integrada (DI) de las mujeres controles analizadas, mientras que para las pacientes con LIE-BG mostró una DI de 2.70×10^3 y para las LIE-AG una DI de 11.2×10^3 . El análisis estadístico muestra diferencia significativa

($p < 0.01$) entre las pacientes con LIE-BG y LIE-AG. No muestra diferencia significativa entre el grupo control vs LIE-BG (Tabla 7).

NEGATIVO=LIE-BG≠LIE-AG

Tabla 7. Valores de DI obtenida por el Image J en las hibridaciones con sonda de secuencia única 1p36 (roja) en las muestras de mujeres controles y pacientes con LIE-BG y LIE-AG.

Grupo	n (células)	DI
Control (-)	150	4.76×10^3
LIE-BG	150	2.70×10^3
LIE-AG	150	11.2×10^3

7.9.2 Análisis de imagen 1ptel

En el caso de la sonda 1ptel (verde) que fue usada como control interno el análisis de imagen con el software Image J arrojó un valor de 5.42×10^3 de densidad integrada (DI) de las mujeres controles analizadas, mientras que para las pacientes con LIE-BG mostró una DI de 6.31×10^3 y para las LIE-AG una DI de 4.35×10^3 . El análisis estadístico no muestra diferencia significativa entre los grupos: control negativo y los grupos de pacientes (LIE-BG y LIE-AG) (Tabla 8).

NEGATIVO=LIE-BG=LIE-AG

Tabla 8. Valores de DI obtenida por el Image J en las hibridaciones con sonda de secuencia única 1ptel (verde) utilizada como control en las muestras de mujeres controles y pacientes con LIE-BG y LIE-AG.

Grupo	n (células)	DI
Control (-)	150	5.42×10^3
LIE-BG	150	6.31×10^3
LIE-AG	150	4.35×10^3

7.10 Sonda de secuencia única 3q26 PIK3CA

En la figura 15 se muestran los resultados de las hibridaciones realizadas con la sonda de secuencia única 3q26 PIK3CA en mujeres controles (a), y pacientes con LIE-BG (b) y LIE-AG (c).

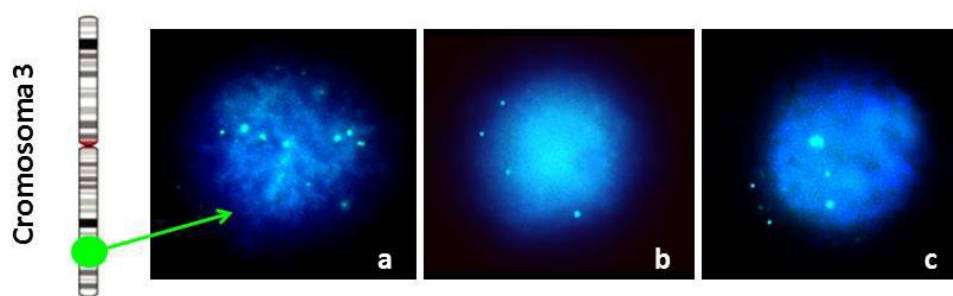


Figura 15. Células de raspado cervical después de tratamiento de DBD–FISH hibridadas con sonda de secuencia única 3q26 PIK3CA marcada en verde y contrastada con DAPI-Antifade. a) Mujeres controles, b) Pacientes con LIE-BG y c) LIE-AG.

7.10.1 Análisis de imagen 3q26 PIK3CA

El análisis de imagen con el software Image J mostró un valor de 2.40×10^3 de densidad integrada (DI) de las mujeres controles analizadas, mientras que para las pacientes con LIE-BG mostró una DI de 7.20×10^3 y para las LIE-AG una DI de 7.10×10^3 . El análisis estadístico muestra diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el grupo de mujeres control y el resto de los grupos, pero no muestra diferencia significativa entre los grupos de pacientes con LIE-BG y LIE-AG (Tabla 9).

$$\text{NEGATIVO} \neq \text{LIE-BG} = \text{LIE-AG}$$

Tabla 9. Valores de DI obtenida por el Image J en las hibridaciones con sonda de secuencia única 3q26 PIK3CA (verde) en las muestras de mujeres controles y pacientes con LIE-BG y LIE-AG.

Grupo	n (células)	DI
Control (-)	150	2.40×10^3
LIE-BG	150	7.20×10^3
LIE-AG	150	7.10×10^3

7.11 Genotipificación VPH

Los genotipos virales más comunes encontrados en las pacientes estudiadas fueron 16, 31, 33, 51, 52, y 54. Todas las pacientes con LIE-AG presentaron infección por VPH de alto riesgo. Se encontraron co-infecciones en el 70% de las pacientes estudiadas. Las mujeres controles fueron negativas para VPH (Tabla 10).

Tabla 10. Genotipos de VPH encontrados en los grupos de pacientes estudiadas.

GENOTIPOS DE VPH														
Grupo/Genotipo	16	18	26	31	33	39	44	51	52	54	68	70	69-71	82
LIE-BG	8	0	1	6	5	0	5	4	6	6	0	0	1	2
LIE-AG	4	0	0	1	1	2	0	2	1	1	1	1	1	0
Total	12	0	1	7	6	2	5	6	7	7	1	1	2	2

8. DISCUSIONES

Nuestros resultados demuestran incremento en la señal de hibridación en las células de pacientes con neoplasia cervical, estudiados con DBD-FISH con sondas específicas, conforme avanza la lesión neoplásica. En el caso de la sonda de genoma completo, hay una marcada diferencia entre los grupos estudiados. El análisis estadístico de los datos de DI obtenidos con el software de análisis de imagen arroja una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el control negativo y el grupo de pacientes con LIE-BG y diferencia significativa ($p < 0.05$) entre LIE-BG y LIE-AG: **NEGATIVO \neq LIE-BG \neq LIE-AG**. Estos resultados fueron validados con la técnica de cometa neutro y alcalino en las células de las pacientes de los diferentes grupos de estudio.

La técnica de DBD-FISH detecta rompimiento tanto doble como simple en la molécula del DNA. El daño simple se validó al emplear la técnica de cometa alcalino y observar el aumento el porcentaje de cometas alcalinos conforme avanza el grado de lesión neoplásica. Esto va de acuerdo a los resultados publicados por Cortés-Gutiérrez y colaboradores en el 2012 estudiando mujeres controles y con diferentes estadíos de CaCU, ellos encontraron un incremento en el porcentaje de cometas severos conforme avanzaba la progresión de la lesión.

El daño doble, se pudo validar al aplicar la técnica de cometa neutro sobre las células de las mujeres controles y pacientes con diferentes grados de CaCU. Se observó incremento en el porcentaje de cometas severos conforme avanza la lesión neoplásica. El daño doble en el DNA es más difícil de reparar por la maquinaria de reparación celular y está asociado con la formación de aberraciones cromosómicas como translocaciones, inversiones, etc., que suelen observarse en el cariotipo de las pacientes con CaCU. Esto concuerda con los antecedentes reportados de alteraciones cromosómicas encontradas en pacientes con CaCU en diferentes cromosomas, pero principalmente en el cromosoma 1 y 3.

Atkin, N.B. (1996), describe que el cromosoma 1 es el cromosoma más frecuentemente involucrado en rearrreglos cromosómicos en aproximadamente el

60% de los tumores de CaCU y otros tipos de cáncer, lo anterior utilizando técnicas de citogenética molecular e hibridación *in situ* fluorescente. Así mismo, Sreekantaiah y colaboradores reportaron alteraciones en el cromosoma 1 en carcinoma cervical, con citogenética habitual. Bulten y colaboradores en 2002, encontraron una fuerte asociación entre las alteraciones numéricas del cromosoma 1 en neoplasia intraepitelial cervical con la infección de VPH de alto riesgo, utilizando técnicas de FISH, PCR y ensayo de hibridación (PCR-LiPA). En el 2005 Cortés-Gutiérrez y colaboradores encontraron asociación entre los estadios del cáncer cervical y la aneusomía del cromosoma 1 estudiando mujeres con diferentes estadios de cáncer y utilizando FISH con sondas centromérica específica del cromosoma 1. Nuestros resultados coinciden con los resultados obtenidos por Cortés-Gutiérrez y colaboradores en el 2013 estudiando la inestabilidad del cromosoma 1 mediante la técnica de DBD-FISH en pacientes con neoplasia cervical.

Al estudiar las células de las pacientes con DBD-FISH hibridadas con la sonda de secuencias repetidas de 5 pb del cromosoma 1 (CEP 1) se observa incremento en la señal de hibridación conforme avanza la lesión neoplásica esto comparado con lo observado con la sonda de 5 pb del cromosoma 8 (CEP 8) utilizada como control, en donde, en reportes previos Cortés-Gutiérrez et al. 2013 no se encontró gran cantidad de sitios lábiles alcalinos. El análisis estadístico de los datos de DI obtenidos con el software de análisis de imagen arroja una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el control negativo y el grupo de pacientes con LIE-BG y diferencia significativa ($p < 0.05$) entre LIE-BG y LIE-AG: **NEGATIVO \neq LIE-BG \neq LIE-AG**. Estos resultados fueron validados con la técnica de cometa-FISH hibridada con sonda CEP 1, en donde se observa un incremento en la presencia de cometas de daño severo conforme se incrementa el grado de lesión y también se observa incremento en la señal de hibridación conforme avanza el grado de severidad del cometa.

En el caso de la sonda de secuencias repetidas de 5 pb del cromosoma 3 (CEP 3) se observa incremento en la señal de hibridación conforma avanza la lesión neoplásica esto comparado con lo observado con la sonda de 5 pb del cromosoma 8 (CEP 8) utilizada como control en donde, en reportes previos Cortés-Gutiérrez et al. 2013 no se encontró gran cantidad de sitios lábiles alcalinos. El análisis estadístico de los datos de DI obtenidos con el software de análisis de imagen muestra que los grupos

control y LIE-BG se comportan de manera similar y no hay diferencia significativa entre ellos. Sin embargo, si se observa diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los grupos LIE-BG y LIE-AG: **NEGATIVO=LIE-BG \neq LIE-AG**. Nuestros resultados corroboran lo observado por Atkin, 1996 en donde reporta que las alteraciones estructurales en el cromosoma 3 están presentes en el 26% de los casos con CaCU, donde se han observado deleciones de brazos cortos y brazos largos de ese cromosoma.

Para la sonda 1p36 de secuencia única, también se observó incremento en el daño de las células y por consecuencia incremento en la señal de hibridación conforme avanza el grado de lesión cancerosa. Esto comparado con los resultados de las DI obtenidas por el software de imagen con la sonda 1ptel utilizada como control. El análisis estadístico muestra que los grupos control y LIE-BG se comportan de manera similar y no hay diferencia significativa entre ellos. En cambio, los valores observados entre los grupos LIE-BG y LIE-AG si arrojan diferencia significativa ($p < 0.01$): **NEGATIVO=LIE-BG \neq LIE-AG**. Estos resultados pueden deberse a que la región 1p36 es una región que ha observado que está muy involucrada como punto de ruptura en diferentes rearrreglos cromosómicos en pacientes con CaCU. Sreekantaiah y colaboradores en 1988, reportaron inversiones en el cromosoma 1 en pacientes con carcinoma cervical, involucrando las bandas 1p36 y 1q32. Además 1p36 es una región susceptible a alteraciones cromosómicas en diferentes tipos de cáncer y se ha demostrado la presencia de varios genes tumor supresor y oncogenes situados en esa región. Algunos de los genes reportados son SKI, TP73, CDC42, entre otros. El gen SKI y es un proto-oncogen que está localizado cercano al gen tumor supresor p73 en 1p36.3. TP73 es también un proto-oncogen de la familia de p53, está involucrado en la regulación del ciclo celular y en la inducción de la apoptosis y CDC42 es un gen cuya proteína 42 es reguladora del control del ciclo celular. En la sonda 1ptel no se observó diferencia significativa entre los grupos **NEGATIVO=LIE-BG=LIE-AG**, como era de esperarse por ser un control interno.

Para la sonda de secuencia única 3q26 se observó incremento en la señal de hibridación al comparar el control negativo con el resto de los grupos, mediante el análisis estadístico de los datos de DI se comprobó que si hay diferencia significativa ($p < 0.05$) con el control negativo y el resto de los grupos (LIE-BG y

LIE-AG): **NEGATIVO**≠**LIE-BG**=**LIE-AG**. En esta región cromosómica se encuentran algunos genes importantes en el desarrollo del cáncer como lo son TERC y PIK3CA. El gen TERC es el responsable de proveer la información necesaria para que se sintetice el RNA que es parte de la telomerasa, la cual mantiene los telómeros de los cromosomas. En la mayoría de las células, los telómeros se vuelven progresivamente más cortos cada vez que la célula se divide y la telomerasa es indetectable o activa a niveles muy bajos. Sin embargo, es muy activa en las células que se dividen rápidamente, como las células que recubren los pulmones y el tracto gastrointestinal, células de la médula ósea, células del feto en desarrollo y en las células cancerosas, que crecen y se dividen sin control ni orden. Una explicación a nuestros resultados puede ser que desde el momento en que la paciente entra en la etapa de displasia leve estos genes se activen debido a la proliferación celular que existe y por eso no encontremos diferencia entre LIE-BG y LIE-AG. Esta región es susceptible a mutaciones y rearrreglos cromosómicos, Atkin en 1996 reportó pérdida de heterocigocidad de 3q particularmente de 3q24-3q28, esto por técnicas de citogenética habitual. En esta región se localiza el gen PIK3CA, que codifica para la proteína P110 alfa (p110α), que es una subunidad de una enzima llamada fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). Esta enzima es importante para muchas actividades celulares, incluyendo el crecimiento, la división y proliferación celular, la migración de las células, la producción de nuevas proteínas, el transporte de materiales dentro de las células, y la supervivencia celular. En base a lo encontrado en las células de las pacientes con diferentes grados de neoplasia cervical analizadas en el presente estudio, podemos discutir que probablemente este gen se encuentre alterado desde el inicio del desarrollo neoplásico.

Los tipos virales más comunes que se encontraron en las pacientes con CaCU fueron 16, 31, 33, 51, 52, y 54, diferente a lo reportado en la literatura mundial donde los más comunes son 16 y 18. Aguilar-Lemanrroy y colaboradores en 2015 realizaron un meta análisis sobre prevalencia de VPH a nivel mundial y en México utilizando el Linear Array® HPV Genotyping Test como prueba diagnóstica. Ellos estudiaron 822 muestras de mujeres de una edad entre 18 y 87 años. Encontraron infección por VPH en 12.4% de las mujeres controles, 46.3% de mujeres con neoplasia intraepitelial 1 y 100% en mujeres con neoplasia intraepitelial 3 o cáncer cervical. El VPH 16 fue el

que tuvo mayor prevalencia en todos los grupos estudiados y los VPH más frecuentes encontrados fueron 16, 18, 45, 52, 58, 39 y 71 (Aguilar-Lemanrroy et al. 2015).

En el presente estudio encontramos un 70% de muestras con co-infecciones, es decir la presencia de 2 o más tipos de VPH de alto y bajo riesgo, lo cual correlaciona con lo encontrado por Aguilar-Lemanrroy y colaboradores en 2015, donde encontraron un 58.2% de co-infecciones en pacientes con neoplasia intraepitelial cervical grado 1 y 60% en pacientes con neoplasia intraepitelial cervical grado 3 (Aguilar-Lemanrroy et al. 2015).

Nosotros encontramos que todos los pacientes con LIE-AG presentaron infección por VPH de alto riesgo. Las mujeres que desarrollan neoplasia cervical son más propensas al daño al DNA lo cual debe de explicar porque algunas mujeres desarrollan CaCU después de la infección por el VPH y otras no. Estudios previos han demostrado asociación entre VPH de alto riesgo e inestabilidad cromosómica (Cortés-Gutiérrez et al. 2010). Se piensa que puede existir un proceso desorganización de la cromatina después de la infección por VPH ya que en varios estudios se han reportado cambios en la organización de la cromatina durante la carcinogénesis y la subsecuente asociación distorsionada de las proteínas de unión al DNA con la matriz nuclear, la cual puede tener un papel funcional en la organización de la cromatina y la regulación de genes. Otro fenómeno importante es la metilación de secuencias de DNA. En estudios con líneas celulares se observó que la metilación es más frecuentemente observada en líneas celulares VPH positivas que en células VPH negativas, lo que sugiere que las células infectadas por VPH intentan silenciar el virus metilando el DNA lo cual puede causar la hipermetilación observada en algunas secuencias repetidas como LINE 1. Se piensa que la acumulación de metilación aberrante en el DNA en tejidos no cancerosos puede ser un mecanismo epigenético de cancerización, lo cual predispone al desarrollo de cáncer (Hattori et al. 2016, Sun et al. 2015).

La presencia de esa inestabilidad en las secuencias de DNA satélite en el genoma puede alterar la organización de la eucromatina y del medio ambiente nuclear. La metilación y las modificaciones de las histonas están progresivamente comprometidas en cáncer. La hipometilación de satélite II que involucra regiones

pericentroméricas del cromosoma 1 ha sido reportada en BRCA1, cáncer pancreático y otros cánceres epiteliales. La hipometilación de los promotores de oncogenes y a hipometilación de genes supresores de tumor como los encontrados en 1p36 y 3q26 son alteraciones esenciales en la tumorigénesis. Múltiples investigaciones han encontrado que la metilación de DNA ocurre frecuentemente en NIC 3 y cáncer cervical, pero raramente ocurre en NIC 1 y células normales lo que sugiere que la metilación aberrante indica un riesgo incrementado de cáncer cervical.

En base a los resultados obtenidos, nosotros proponemos el empleo de la metodología de DBD-FISH para evaluar la progresión de la enfermedad. Se requieren estudios futuros para que esta metodología sea validada y que se pueda ofrecer como metodología diagnóstica-pronóstica del CaCU.

La aplicación de la técnica de DBD-FISH con sondas específicas para la detección de daño en el DNA en regiones sensibles a desestabilización puede proporcionar una herramienta esencial para la identificación de las células que se encuentran en riesgo de progresión.

9. CONCLUSIONES

En este trabajo demostramos:

- El daño observado en las células de epitelio cervical de las pacientes con diferentes grados de neoplasia estudiadas en este trabajo, existe inestabilidad en regiones específicas del DNA de 5 pb (CEP 1 y CEP 3) y de secuencias específicas (1p36 y 3q26) y que esta aumenta conforme avanza la lesión neoplásica.
- Los resultados permitieron distinguir entre LIE-BG y LIE-AG, con todas las sondas específicas analizadas.
- Esto nos permite sugerir que estas secuencias puedan ser empleadas como Biomarcadores en estudios de progresión de la lesión del CaCU y servir de utilidad como prueba para el manejo clínico de las mujeres con neoplasia cervical.
- Sugerimos, en base a los resultados obtenidos, que la progresión a transformación maligna en las pacientes con neoplasia cervical, involucra un incremento en la inestabilidad de los cromosomas 1 y 3.
- Nuestros resultados sugieren la presencia de cromotripsis en las pacientes con diferentes estadios de CaCU, en los cromosomas estudiados.

10.PERSPECTIVAS

Sugerimos realizar estudios de secuenciación del DNA de nueva generación, para poder demostrar el fenómeno de cromotripsis. Así como estudios de metilación de genes localizados en las secuencias únicas estudiadas en el presente trabajo.

11. BIBLIOGRAFIA

Adam E, Berkova Z, Daxnerova Z. 2000. Papillomavirus detection: demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease. *American Journal Obstetrics and Gynecology*. 182:257-64.

Aguilar-Lemarroy A, Vallejo-Ruiz V, Cortés-Gutiérrez EI, Salgado-Bernabé ME, Ramos-González NP, Ortega-Cervantes L, Arias-Flores R, Medina-Díaz IM, Hernández-Garza F, Santos-López F, Piña-Sánchez P. 2015. Human Papillomavirus Infections in Mexican Women with Normal Cytology, Precancerous Lesions, and Cervical Cancer: Type-Specific Prevalence and HPV Coinfections. *J of Med Virology*. DOI 10.1002/jmv.24099.

Anderson RGW. 1993. Caveolae: Where incoming and outgoing messengers meet. Review. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:10909-13.

Apt D, Chong T, Liu Y, Bernard HU. 1993. Nuclear factor I and epithelial cell-specific transcription of human papillomavirus type 16. *Journal of Virology*. 67:4455-63.

Atkin, NB. 1997. Cytogenetics of carcinoma of the cervix uteri: A review. *Cancer Genetic and Cytogenetics*. 95:33-9.

Bachtiary B, Obermair A, Dreier B. 2002. Impact of multiple HPV infection on response to treatment and survival in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *International Journal of Cancer*. 102:237-43.

Bagchi A and Mills A. 2008. The Quest for the 1p36 Tumor Suppressor. *Cancer Research*. 68: 2551–56.

Bauknecht T, Angel P, Royer HD. 1992. Identification of a negative regulatory domain in the HPV 18 promoter; interaction with the transcriptional repressor YY1. *EMBO J*. 11:4607–17.

Bauknecht T, Jundt F, Herr I. 1995. A switch region determines the cell type-positive or negative action of YY1 on the activity of the human papillomavirus type 18 promoter. *Journal of Virology*. 69:1-12.

Bosch FX, de Sanjose S: Chapter 1. 2003. Human papillomavirus and cervical cancer burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*. 3:3-13.

Bouallaga I, Massicard S, Yaniv M. 2000. An enhanceosome containing the Jun B/Fra-2 heterodimer and the HMG-I(Y) architectural protein controls HPV 18 transcription. *EMBO. Rep*. 1:422-27.

Bouallaga, I, Thierry F. 1999. Control of Human Papillomavirus type 18 transcription: role in carcinogenesis. *Recent Research Developments in Virology*. 1: 369-83.

Boyer SN, Wazer DE, Band V. 1996. E7 protein 52 of human papillomavirus 16 induces degradation of the retinoblastoma protein through the ubiquitinproteosome pathway. *Cancer Research*. 56:4620-4.

Bulten J, Melchers W, Kooy-Smits M, de Wilde P, Pooddighe P, Robben J, Macville M, Massuger L, Bakkers J, Hanselaar A. 2002. Numerical aberrations of chromosome 1 in cervical intraepithelial are strongly associated with infection high-risk papillomavirus types. *Journal of Pathology*. 198:300-9.

Burk RD, Kelly P, Feldman J. 1996. Declining presence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex. Trans. Dis*. 23:333-41.

Burk RD, Ho GY, Beardsley L. 1996. Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *J. Infect. Dis*. 174:679-89.

Butz K, Hoppe-Seyler F. 1993. Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: composition of the HPV type 18 upstream regulatory region. *J. Virol*. 67:6476-86.

Castaño M, Hurtado G. 2012. Test de VPH (captura de híbridos II) en pacientes tratadas con radiofrecuencia. Arch Inv Mat Inf. 1:13-21.

Chacóna J , Mateosa ML, Sanzb I, Rubioc MD, Baqueroa F. 2006. Genotipos de virus del papiloma humano más frecuentes en mujeres con citología cervicovaginal alterada utilizando técnicas de captura de híbridos y reacción en cadena de la polimerasa. Clin Invest Gin Obst. 33:97-101.

Cheung AN, Szeto EF, Leung BS, Khoo US, Ng AW. 2003. Liquid based cytology and convencional cervical smears. Cancer. 99:331-5.

Rodríguez-Reyes R, Cerda-Flores R, Quiñonez-Pérez J, Velásco-Rodríguez, Cortés-Gutiérrez E. 2002. Acetic acid test. A promising screening test for early detection of cervical cáncer. Analytical and quantitative cytology and histology 24:134-36.

Cortés-Gutiérrez E, Dávila-Rodríguez MI, Muraira-Rodríguez M, Said-Fernández S, Cerda-Flores R. 2005. Association between the stages of cervical cancer and chromosome 1 aneusomy. Cancer Genetics and cytogenetics 159:44-47.

Cortés-Gutiérrez E, Dávila-Rodríguez M, Vargas-Villarreal J, Hernández-Garza F, Cerda-Flores R. 2010. Association between human papiloma virus-type infections with micronuclei frequencies. Prague Medical Report. 111:35–41.

Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, Fernández JL, López-Fernández C, Gosálvez. 2011. DNA damage in women with cervical neoplasia evaluated by DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization. J.Anal Quant Cytol Histol. 33:175-81.

Cortés-Gutiérrez EI, Hernández-Garza F, García-Pérez JO, Dávila-Rodríguez MI, Aguado-Barrera ME, Cerda-Flores RM. 2012. Evaluation of DNA single and double strand breaks in women with cervical neoplasia based on alkaline and neutral comet assay techniques. J Biomed Biotechnol. 385245.

Cortés-Gutiérrez EI, Ortiz-Hernández BL, Dávila-Rodríguez MI, M CF, Fernández JL, López-Fernández C, Gosálvez J.Int J Mol Sci. 2013. 5-bp Classical Satellite

DNA Loci from Chromosome-1 Instability in Cervical Neoplasia Detected by DNA Breakage Detection/Fluorescence in Situ Hybridization (DBD-FISH). 14:4135-47.

Crasta K, Ganem NJ, Dagher R, Lantermann AB, Ivanova EV, Pan Y, Nezi L, Protopopov A, Chowdhury D and Pellman D. 2012. DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature* 482:53-58.

Day PM, Roden RBS, Lowy DR. 1998. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication E2, to PML oncogenic domains. *J. Virol.* 72:142-50.

Day PM, Lowy DR, Schiller JT. 2003. Papillomavirus infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology.* 307:1-1.

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 324:17–27.

Dong XP, Stubenrauch F, Beyer-Finkler E, Pfister H. 1994. Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV-16 DNA from cervical cancers. *Int. J. Cancer.* 58:803–808.

Doorbar J, Ely S, Sterling J. 1991. Specific interaction between HPV 16 E1 - E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature.* 352:824–7.

Doorbar J, Foo C, Coleman N. 1997. Characterisation of events during the late stages of HPV 16 infection in vivo using high affinity synthesis fabs to E4. *Virology.* 238: 40–52.

Doorbar, J. 2005. The papillomavirus life cycle. *J. Clin. Virol.* 32:S7–S15.

Eastmond D, Rupa D, Hasegawa L. 1994. Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence in situ hybridization with DNA probes. *Mutat. Res.* 322:9–20.

Evander M, Frazer IH, Payne E. 1997. Identification of the alpha-6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol*, 71:2449-56.

FDA. US Department of health and human services. US Food and drug administration Vaccines HPV. <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/ucm172678.htm> (revisado Junio del 2016).

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Globocan 2012, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase n. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. [Internet] Disponible en: <http://globocan.iarc.fr> (revisado Junio del 2016).

Fields AP, Justilien V, Murray NR. 2016. The chromosome 3q26 OncCassette: A multigenic driver of human cancer. *Adv Biol Regul*. 60:47-63.

Forment JV, Kaidai A. and Jackson SP. 2012. Chromothripsis and cancer causes and consequences of chromosome shattering. *Nature Reviews*. 12:663-70.

Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP. 1999. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J. Infect Dis*. 180:1415–23.

Frattoni MG, Lim HB, Laimins LA. 1996. In vitro synthesis of oncogenic HPVs requires episomal genomes for differentiation-dependent late gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 93:3062–7.

Gardasil www.gardasil.com (revisado Junio del 2016).

Groglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M. 2001. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J. Virol*. 75:1565-70.

Giuliano AR, Harris R, Sedjo RL. 2002. Incidence, prevalence and clearance of type-specific human papillomavirus infections; The Young Women's Health Study. *J. Infect Dis*. 186:462–9.

Glaxo Smith Kline www.glaxosmithkline.cervarix (revisado Junio del 2016).

Hattori N and Ushijima T. 2016. Epigenetic impact of infection on carcinogenesis: Mechanisms and applications. *Genome Medicine*. 8:10

Hengstermann A, Linares LK, Ciechanover A. 2001. Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc. Natl Acad Sci USA*. 98:1218–23.

Heselmeyer-H K, Sommerfeld K, White NM, Chaudhri N, Morrison LE, Palanisamy N, Yuan Wang Z, Auer G, Steinberg W and Ried T. 2005. Genomic Amplification of the Human Telomerase Gene (*TERC*) in Pap Smears Predicts the Development of Cervical Cancer. *American Journal of Pathology*. 116:1229-38.

Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE. 1994. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J. Infect. Dis*. 169:235–40.

Ho GY, Bierman R, Beardsley L. 1998. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N. Engl. J. Med*. 338:423–8.

Holowaty P, Miller AB, Rohan T. 1999. Natural dysplasia of the uterine cervix. *J. Natl. Cancer Inst*. 91:252-58.

Hoppe-Seyler F, Butz K, Zur Hausen H. 1991. Repression of the human papillomavirus type 18 enhancer by the cellular transcription factor Oct- 1. *J. Virol*. 65:5613-18.

INNO-LiPA

http://search.cosmobio.co.jp/cosmo_search_p/search_gate2/docs/IGT_/8106381064.20130815.pdf (revisado Junio del 2016).

Kirchhausen T. 2000. Clathrin. *Annu Rev Biochem*. 69: 699-727.

Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, 1992: Papillomavirus L1 major capsid protein self – assembles into virus – like particles that are highly immunogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:12180-4.

Kloosterman WP, Hoogstraat M, Paling O, Tavakoli-Yaraki M, Renkens I, Vermaat J, van Roosmalen MJ, van Lieshout S, Nijman IC, Roessingh W, van't Slot R, van de

Belt J, Gurvey V, Koudijs M, Voest E and Cuppen E. 2011. Chromothripsis is a common mechanism driving genomic rearrangements in a primary and metastatic colorectal cancer. *Genome Biology*. 12:R103.

Kloosterman WP, Gurvey V, van Roosmalen MJ, Duran KJ, de Bruijin E, Bakker SC, Letteboer T, van Nesselrooij B, Hoechstnach R, Poot M, and Cuppen E. 2011 a. Chromothripsis as a mechanism driving complex de novo structural rearrangements in the germline. *Human Molecular Genetics*. 20:1916-1924.

Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM. 2002. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N. Engl. J. Med*. 347: 1645-51.

Krajewski S, Krajewska M, Reed JC. 1996. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bak expresión, a proapoptotic member of the Bcl- 2 protein family. *Cancer Res*. 56:2849 -55.

Leal-Garza C y Cortés-Gutiérrez E. 1996. Detección molecular del virus del papiloma humano en mujeres con cáncer cérvico-uterino. *Gac Med Mex* 132:296-300.

Leal-Garza C, Cerda-Flores R, Leal-Elizondo E, Cortés-Gutiérrez E. 2002. Micronuclei in cervical smears and peripheral blood lymphocytes from women with and without cervical uterine cancer. *Mutat. Res*. 515:57–62.

Li M, Beard P, Estes PA. 1998. Intercapsomeric disulphide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *Journal of Virology*. 72:2160-7.

Ling Peh W, Middleton K, Christensen N, Nicholls P, Egawa K, Sotlar K. 2002. Life Cycle Heterogeneity in Animal Models of Human Papillomavirus- Associated Disease. *Journal of Virology* 76:10401-16.

LINEAR ARRAY® HPV Genotyping Test
<http://molecular.roche.com/assays/Pages/LINEARARRAYHPVGenotypingTest.aspx>
(revisado Junio del 2016).

Liu P, Erez A, Nagamani SC, Dhar SU, Kolodziejska KE, Dharmadhikari AV, Cooper ML, Wiszniewska J, Zhang F, Whitters MA, Bacino CA, Campos-Acevedo LD, Delgado MR, Freedenberg D, Garnica A, Grebe TA, Hernández-Almaguer D,

Immken L, Lalani SR, McLean SD, Northrup H, Scaglia F, Strathearn L, Trapane P, Kang SH, Patel A, Cheung SW, Hastings PJ, Stankiewicz P, Lupski JR, Bi W. 2011. Chromosome catastrophes involve replication mechanisms generating complex genomic rearrangements. *Cell*. 146:889-903.

López-Saavedra A, Lizano-Soberón M. 2006. Cáncer cérvico uterino y virus del papiloma humano. La historia que no termina. *Cancerología*. 1:31-55.

Magnusson PKE, Lichtenstein P, Gyllenstein UB. 2000: Heritability of cervical tumors. *Int. J. Cancer*, 88:698-701.

Magrangeas F, Avet-Loiseau H, Munshi NC, Minvielle S. 2011. Chromothripsis identifies a rare and aggressive entity among newly diagnosed multiple myeloma patients. *Blood*. 118:675-678.

Maher CA, Wilson RK. 2012. Chromothripsis and human piecing together the shattering process. *Cell*. 148:29-32.

Mantovani F, Banks L. 1999. Inhibition of E6 induced degradation of p53 is not sufficient for stabilization of p53 protein in cervical cancer derived cell lines. *Oncogene* 18:3309–15.

Mantovani F, Banks L. 2001. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*. 20:7874–87.

May M, Dong XP. 1994. The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV-16 DNA in cervical cancers escapes from cellular repression by mutation of target sequences for YY1. *EMBO J*. 13:1460–66.

Morris PJ, Dent CL, Ring CJ, Latchman DS. 1993. The octamer binding site in the HPV16 regulatory region produces opposite effects on gene expression in cervical and non-cervical cells. *Nucleic Acids Res*. 21:1019-23.

Münger K, Basile JR, Duensing S. 2001. Actividades biológicas y blancos moleculares de la oncoproteína E7 del virus del papiloma humano. *Oncogen*. 20: 7888–98.

Münger K, Baldwin A, Edwards K, Hayakawa, H, Nguyen C, Owens M, Grace M, Huh K. 2004. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J. Virol.* 78:11451–60.

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 348:518–27.

Negrini BP, Schiffman MH, Kurgan RJ. 1990. Oral contraceptive use, human papillomavirus infection, and risk of early cytological abnormalities of the cervix. *Cancer Res.* 50:4670–5.

Phelps W and Howley P. 1987. Transcriptional trans-Activation by the Human Papillomavirus Type 16 E2 Gene Product. *Journal of Virology.* 61:1630-38.

Prendiville W and Davies P. 2004. HPV handbook 1: Human papillomavirus and cervical cancer. Taylor & Francis Group.

Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>. 1997-2012.

Raush T, Jones DTW, Zapatka M, Stutz AM, Zichner T, Weischenfeldt J, Jager N, Remke M, Shih D, Northcott PA, Pfaff E, Tica J, Wang Q, Massimi L, Witt H, Bender S, Pleier S, Cin H, Hawkins C, Beck C, von Deimling A, Hans V, Brors B, Eils R, Scheurlen W, Blake J, Benes V, Kulozik AE, Witt O, Martin D, Zhang C, Porat R, Merino DM, Wasserman J, Jabado N, Fontebasso A, Bullinger L, Rücker FG, Döhner K, Döhner H, Koster J, Molenaar JJ, Versteeg R, Kool M, Tabori U, Malkin D, Korshunov A, Taylor MD, Lichter P, Pfister SM, Korbel JO. 2012. Genome sequencing of pediatric medulloblastoma links catastrophic DNA rearrangements with TP53 mutations. *Cell* 148:59-71.

Ricci P, Perucca E, Koljanin J, Baeriswyl E. 2004. Citología de base líquida: Revisión de la historia y los estudios al respecto. *Rev Chil Obstet Ginecol.* 69:256-262

Richart RM. 1990. A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol.* 75:131-3.

Rivera R, Delgado J, Painel V, Barrero R, Larraín A. 2006. Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por el virus del papiloma humano en el epitelio cervical. *Rev Chil Obstet Ginecol.* 71:135-40.

Rous P, Beard JW. 1935. Progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas. *J. Exp. Med.* 62:523-45.

Rusan M, Li Y, and Hammerman P. 2015. Genomic Landscape of Human Papillomavirus–Associated Cancers. *Clinical Cancer Research.* 21:2009-19.

Sánchez-Anguiano LF, Alvarado-Esquivel C, Reyes-Romero MA, Carrera-Rodríguez M. 2006. Human papillomavirus infections in women seeking cervical Papanicolaou cytology of Durango, Mexico: prevalence and genotypes. *BMC Infect Dis.* 6:27.

Schiffman MH. 1992. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* 84:394–8.

Shope R, Hurst W. 1933. Infectious Papillomatosis of Rabbits with a note on the histopathology. *The Journal of Experimental Medicine.* 58:607–24.

Singh N, McCoy M, Tice R, Schneider E. 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-91.

Snijders P, Steenbergen R, Heideman D, Meijer C. 2006. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J. Pathol.* 208:152–64.

Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N. 2002. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA.* 287:2114-9.

Sreekantaiah, C, Bhargava K, Shetty J. 1988. Chromosome 1 abnormalities in cervical carcinoma. *Cancer* 62:1317-24.

SS. Lineamientos para la aplicación de las vacunas VPH en México. <http://www.programassociales.org.mx/sustentos/Oaxaca518/archivos/LINEAMIENTOS%20DE%20VAC%20VPH.pdf>. (revisado Junio del 2016).

Stephens P, Greenman C, Fu B, Yang F, Bignell G, Mudie L, Pleasance E, Wai Lau K, Beare D, Stebbings L, McLaren S, Lin M, McBride D, Varela I, Nik-Zainal S, Leroy C, Jia M, Menzies A, Butler A, Teague J, Quail M, Burton J, Swerdlow H, Carter N, Morsberger L, Iacobuzio-Donahue C, Follows G, Green A, Flanagan A, Stratton M, Futreal P and Campbell P. 2011. Massive Genomic Rearrangement acquired in a Single catastrophic event during cancer development. *Cell*. 144:27-40.

Sun Y, Li S, Shen K, Ye S, Cao D, Yang J. 2015. DAPK1, MGMT and RARB promoter methylation as biomarkers for high-grade cervical lesions. *Int J Clin Exp Pathol*. 8:14939-45.

Thierry F, Spyrou G, Yaniv M, Howley P. 1992. Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. *J. Virol*. 66:3740-48.

Ullmann EV. 1923. On the aetiology of the laryngeal papilloma. *Acta Oto-laryngol*, 5:317-34.

Wilson VG, West M, Woytek K. 2002. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes*. 24:275-90.

Woodman C, Collins S, Young L. 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews Cancer*. 7:11-22.

Yoon CS, Kim KD, Park SN and Cheong SW. 2001. Alpha (6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun*, 283:668-73.

Zhou J, Sun X, Stenzel . 1991. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology*. 185:251–7.

Zur Hausen H. 1982. Human genital cancer; synergism between two virus infections and/or synergism between a virus infection and initiating events? *Lancet* II. 1370–72.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Catalina García Vielma

**Candidato para el Grado de
Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología**

**Tesis: INESTABILIDAD CROMOSÓMICA ESPECÍFICA
EN NEOPLASIA CERVICAL EVALUADA MEDIANTE TECNICAS
DE CITOGENETICA MOLECULAR**

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales

Nacida en General Cepeda, Coahuila El 25 de Junio de 1970. Hija de Mónica Vielma Rodríguez y Raúl García Álvarez.

Casada, Esposo: Agustín Amaury Lara Lagunas.

Hija: Kathia Daniela Lara García.

Educación

- Licenciatura: Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., 1992.
- Especialidad: Citogenética. Instituto Nacional de Pediatría e Instituto Nacional de Perinatología, México, D.F. Marzo 1994-Febrero 1995.
- Maestría: En Ciencias con Especialidad en Genética. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., 2005.

Experiencia Profesional

- Citogenetista. Responsable del Departamento de Genética. Laboratorios de Análisis Clínico Médicos “Dr. Moreira”. Monterrey, N.L. Junio de 1999 a Febrero del 2011.
- Asistente de Investigación. Laboratorio de Medicina Molecular y Terapia Celular. Hospital y Clínica OCA, Monterrey, N.L. Mayo de 2005 a Enero de 2008.
- Perito en análisis de indicios (DNA). Departamento de Identificación.
- Dirección de Servicios Periciales de la Procuraduría General de Justicia.
- Gobierno del Estado de Nuevo León. Monterrey, N.L., Julio 2000 a Julio 2001.
- Personal Profesional no docente con licenciatura, de planta. Área de Genética Humana, Departamento de Patología. Facultad de Medicina, U.A.N.L., Monterrey, N.L. Noviembre 1992 a Septiembre de 1999.

Publicaciones

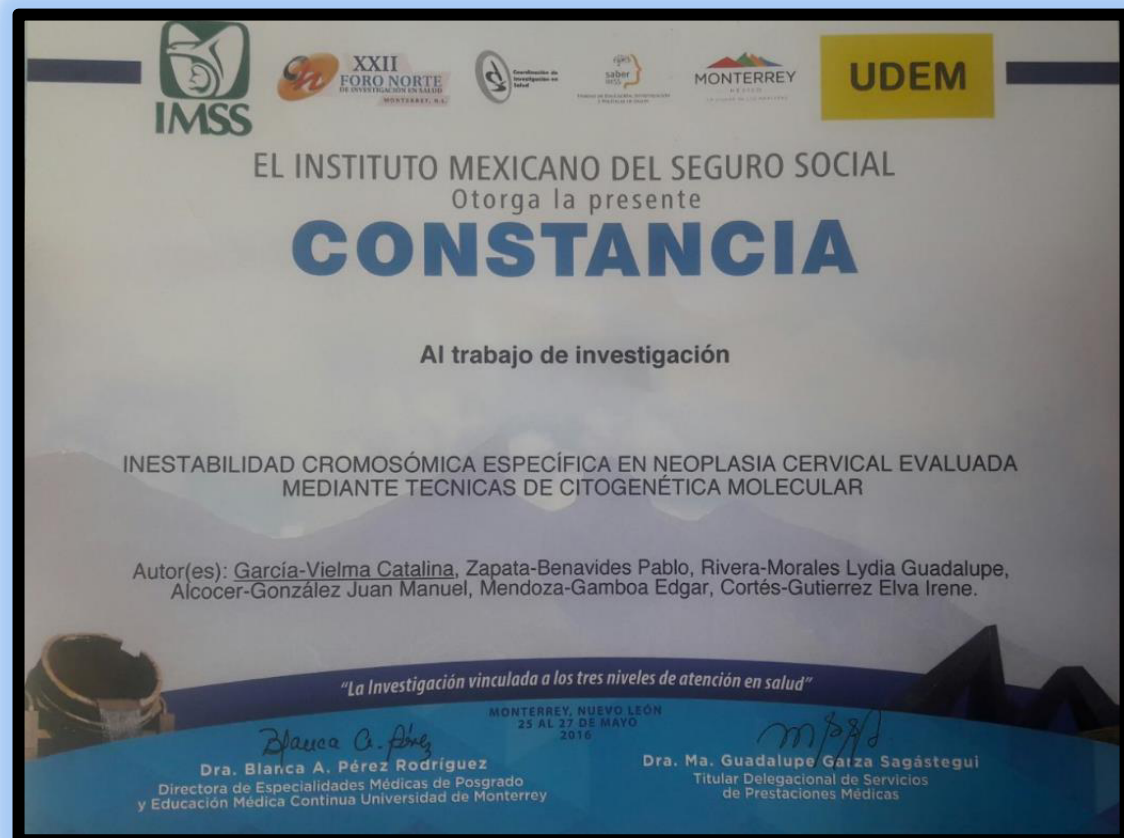
- Cortés-Gutiérrez EI, García-Vielma C, Aguilar-Lemarroy A, Vallejo-Ruíz V, Piña-Sánchez P, Zapata- Benavides P, Jaime Gosálvez. Expression of the HPV18/E6 oncoprotein induces DNA damage. **ACEPTADO** para publicación: *European Journal of Histochemistry*. Marzo de 2017.
- [Digital image analysis of AgNORs in cervical smears of women with premalignant and malignant lesions of the uterine cervix.](#) García-Vielma C, Dávila-Rodríguez MI, Hernández-Garza F, Cerda-Flores RM, Cortés-Gutiérrez EI. *Biotech Histochem*. 2016;91(2):102-7.
- [Emanuel syndrome \(supernumerary derivative 22\), the result of a maternal translocation. A case report.](#) García-Vielma C, de la Rosa-Alvarado RM, Nieto-Martínez K, Cortes-Gutiérrez EI, de la Fuente-Cortez B. *J Assoc Genet Technol*. 2010;36(4):189-93.
- [Chromosome abnormalities in northeastern Mexico: ten years of experience in a private laboratory \(1999-2009\).](#) García-Vielma C, de la Fuente-Cortez B, Méndez-Ramírez CA, González LR, Moreira-Flores R, Cerda-Flores RM. *J Assoc Genet Technol*. 2010;36(3):102-6.
- [Chromosomal abnormalities and polymorphic variants in couples with repeated miscarriage in Mexico.](#) De la Fuente-Cortés BE, Cerda-Flores RM, Dávila-Rodríguez MI, García-Vielma C, De la Rosa Alvarado RM, Cortés-Gutiérrez EI. *Reprod Biomed Online*. 2009 Apr;18(4):543-8.

LOGROS ALCANZADOS

- Presentación del trabajo en el XX Foro Delegacional de Investigación en Salud, IMSS. Monterrey, N.L. Enero del 2016.



- Presentación del trabajo en el XXII Foro Norte de Investigación en Salud.
IMSS. Monterrey, N.L. Mayo del 2016.



- Artículo **ACEPTADO** para publicación:

Cortés-Gutiérrez EI, García-Vielma C, Aguilar-Lemarroy A, Vallejo-Ruiz V, Piña-Sánchez P, Zapata- Benavides P, Jaime Gosálvez. Expression of the HPV18/E6 oncoprotein induces DNA damage. *European Journal of Histochemistry*. Marzo de 2017.



De: Prof. Carlo Pellicciari <ejh@unipv.it>

Para: Elva I. Cortés Gutiérrez <elvacortes@cibinmty.net>

CC: Nadia Moscato <nadia.moscato@pagepress.org>

Enviado: Lunes, 20 de marzo, 2017 3:08:55

Asunto: [EJH] European Journal of Histochemistry (paper #2773) - Editorial Decision

Dear Dr. Cortés Gutiérrez,

The revised version of your manuscript "Expression of the HPV18/E6 oncoprotein induces DNA damage" has been reviewed by the Editors: their decision is that it is **acceptable for publication** but a minor revision is still necessary. Reference no. 20 should be quoted as follows: Fernández JL, Gosálvez J. Application of FISH to detect DNA damage. DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH). *Methods Mol Biol*. 2002;203:203-16. As already requested in my previous message, you should submit the revised text and table as a .doc file, and the Figures as .tif or .jpg files with a resolution of at least 300 dpi at the final printing size (width: 20 cm).

To submit the revised version:

1. Log in;
2. Click on your role as Author;
3. Click on IN REVIEW: REVISIONS REQUIRED on the page displayed (under the heading 'Status', near the manuscript title);

4. Under the heading EDITOR DECISION, upload your revised paper as AUTHOR VERSION using Browse and Upload buttons;
5. Use the NOTIFY EDITOR e-mail button to inform the Editors that the revised version has been submitted.

As soon as the appropriate files are uploaded you will be notified the manuscript acceptance.
Thank you for your collaboration and best regards,
Carlo Pellicciari

Editor-in-Chief, European Journal of Histochemistry
Department of Biology and Biotechnology "Lazzaro Spallanzani", University of
Pavia
via A. Ferrata, 9
Phone +39.0382.986420
27100 Pavia, Italy

European Journal of Histochemistry
<http://www.ejh.it>

European Journal of Histochemistry - ejh

www.ejh.it
